

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490813 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.30

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.18

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61P 9/12* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)  
*A61P 13/12* (2006.01)

(54) МАЛАЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩАЯ РНК, НАЦЕЛЕННАЯ НА АНГИОТЕНЗИНОГЕН, И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОЙ ИНТЕРФЕРИРУЮЩЕЙ РНК

(31) 202111398206.0; 202111542323.X;  
202210554195.9

(32) 2021.11.19; 2021.12.16; 2022.05.20

(33) CN

(86) PCT/CN2022/132883

(87) WO 2023/088427 2023.05.25

(71) Заявитель:  
ТОЦЗЕ БИОТЕК (ШАНХАЙ) КО.,  
ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:  
Линь Сяоянь, Ли Юньфэй, Чжан  
Чжэнь, Дун Юйцюн, Хоу Чжэ, Чжан  
Цзяньюй, Гэн Цзюнь, Мао Сун,  
Хуан Лунфэй, Чжоу Яцинь, Лв  
Чжэньчжэнь, Хуан Яньфэнь, Хуан  
Цзиньюй (CN)

(74) Представитель:  
Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) МиРНК, нацеленная на ангиотензиноген (AGT), и фармацевтическое применение миРНК. В частности, настоящее изобретение относится к миРНК, нацеленной на ген AGT, конъюгат миРНК или дцРНК, композиции и фармацевтическому применению миРНК. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, клетке или набору, содержащему миРНК, и способу лечения и/или предотвращения нарушений, связанных с AGT (таких как гипертония), для миРНК.

A1

202490813

202490813

A1

МАЛАЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩАЯ РНК, НАЦЕЛЕННАЯ НА  
АНГИОТЕНЗИНОГЕН, И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОЙ  
ИНТЕРФЕРИРУЮЩЕЙ РНК

Настоящее изобретение испрашивает приоритет по патентной заявке Китая CN202111398206.0, поданной 19 ноября 2021 года, патентной заявке Китая CN202111542323.X, поданной 16 декабря 2021 года, и китайской патентной заявке CN202210554195.9, поданной 20 мая 2022 года, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к миРНК (малая интерферирующая РНК), нацеленной на ангиотензиноген (AGT), двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК), конъюгату и их применению.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

AGT также известен как SERPINA8 или ANHU. AGT, кодируемый геном AGT и в основном продуцируемый печенью, представляет собой ограничивающий скорость субстрат ренин-ангиотензиновой системы (RAS), а также является предшественником пептида ангиотензина. Под действием активного ренина в плазме AGT расщепляется на ангиотензин I, который впоследствии превращается в ангиотензин II под действием ангиотензинпревращающего фермента (ACE), экспрессируемого циклически и локально. Ангиотензин II, наиболее важное биологически активное вещество в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (RAAS), вызывает вазоконстрикцию артерий и секрецию адренокортикального альдостерона путем связывания с рецептором ангиотензина II типа 1 (AT1R) и, таким образом, играет ключевую роль в регуляции артериального давления в организме. При сверхпродуцировании ангиотензина II или чрезмерной стимуляции AT1R система RAAS является дисфункциональной, что приводит к гипертонии. Многочисленные исследования показали, что полиморфизм в гене AGT тесно связан с регуляцией и контролем артериального давления в организме, а исследования ассоциаций в китайской популяции Хань показали, что полиморфизм сайта AGT M235T связан с возникновением эссенциальной гипертонии (EH).

Гипертония является распространенным сердечно-сосудистым заболеванием во всем мире, имеет глобальную распространенность до 10-20% и может вызывать цереброваскулярные, сердечные и почечные осложнения, что является основным фактором

риска развития различных заболеваний, расстройств и состояний (например, инсульта, ишемической болезни сердца, хронической болезни почек, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, аневризмы, заболевания периферических артерий, повреждения сердца и других сердечно-сосудистых заболеваний). В настоящее время существует пять основных классов лекарственных средств для лечения гипертензии, включая диуретики,  $\beta$ -блокаторы, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и блокаторы рецепторов ангиотензина II. Несмотря на большое разнообразие противогипертензивных препаратов, доступных для лечения гипертензии, более двух третей субъектов не могут контролироваться одним противогипертензивным препаратом и нуждаются в двух или более различных классах противогипертензивных препаратов. Поскольку комплаентность и побочные эффекты увеличиваются с увеличением приема лекарств, это дополнительно уменьшает количество субъектов с контролируемым артериальным давлением.

РНК-интерференция (РНКи) является эффективным способом подавления экспрессии генов, которая может специфически разрушать мРНК гена-мишени посредством посттранскрипционного регуляторного механизма. Статистически, более 80% белков, связанных с заболеваниями, являются белками, не поддающимися воздействию лекарственных средств, поскольку на них не могут быть нацелены обычные низкомолекулярные лекарственные средства и биомакромолекулярные составы. AGT является наиболее распространенным предшественником RAAS, и было доказано его каскадный эффект на регуляцию артериального давления. Ингибирование синтеза AGT в печени может привести к стойкому снижению белка AGT и, наконец, к стойкому снижению ангиотензина AngII. Этот ингибирующий эффект будет иметь хороший противогипертензивный эффект.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к миРНК, нацеленной на ангиотензиноген (AGT).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к миРНК, которая содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область;

смысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 (например, 0, 1, 2 или 3) нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, и содержит по меньшей мере 15 (например, 16, 17, 18, 19, 20 или 21) смежных нуклеотидов;

антисмысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на

3 (например, 0, 1, 2 или 3) нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12, и содержит по меньшей мере 15 (например, 16, 17, 18, 19, 20 или 21) смежных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь по меньшей мере частично обратно комплементарна последовательности-мишени для опосредования РНК-интерференции. В некоторых вариантах осуществления имеется не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 несоответствия между антисмысловой цепью и последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь полностью обратно комплементарна последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь по меньшей мере частично обратно комплементарна антисмысловой цепи с образованием двухцепочечной области. В некоторых вариантах осуществления имеется не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 несоответствия между смысловой цепью и антисмысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь полностью обратно комплементарна антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления миРНК согласно настоящему изобретению содержит один или два тупых конца.

В некоторых конкретных вариантах осуществления каждая цепь миРНК независимо содержит от 1 до 2 неспаренных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления миРНК согласно настоящему изобретению содержит липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи миРНК.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь независимо друг от друга содержат от 16 до 35, от 16 до 34, от 17 до 34, от 17 до 33, от 18 до 33, от 18 до 32, от 18 до 31, от 18 до 30, от 18 до 29, от 18 до 28, от 18 до 27, от 18 до 26, от 18 до 25, от 18 до 24, от 18 до 23, от 19 до 25, от 19 до 24 или от 19 до 23 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь являются идентичными или различными по длине; смысловая цепь составляет 19-23 нуклеотида в длину, а антисмысловая цепь составляет 19-26 нуклеотидов в длину. Отношение длины смысловой цепи к длине антисмысловой цепи миРНК согласно настоящему изобретению может составлять 19/19, 19/20, 19/21, 19/22, 19/23, 19/24, 19/25, 19/26, 20/19, 20/20, 20/21, 20/22, 20/23, 20/24, 20/25, 20/26, 21/20, 21/21, 21/22, 21/23, 21/24, 21/25, 21/26, 22/20, 22/21, 22/22, 22/23, 22/24, 22/25, 22/26, 23/20, 23/21, 23/22, 23/23, 23/24, 23/25 или 23/26. В некоторых вариантах осуществления отношение длины смысловой цепи к длине антисмысловой цепи миРНК составляет 19/21, 21/23 или 23/25. В некоторых вариантах осуществления отношение длины смысловой цепи к длине антисмысловой цепи

миРНК составляет 19/21.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем на 2 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность отличается не более чем на 1 нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления разница составляет 1 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем на 2 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность отличается не более чем на 1 нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления разница составляет 1 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 21 смежных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из следующего: SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6.

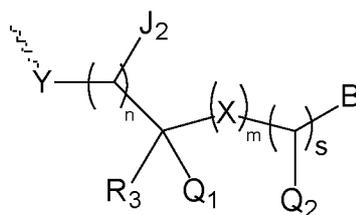
В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из следующего: SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид, содержащийся в каждой смысловой цепи и антисмысловой цепи согласно настоящему изобретению, представляет собой модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи согласно настоящему изобретению представляют собой модифицированные нуклеотиды.

Настоящее изобретение относится к мРНК, которая содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область;

смысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, и содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов; антисмысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12, и содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов; по меньшей мере один нуклеотид в положениях от 2 до 8 (например, положение 2, положение 3, положение 4, положение 5, положение 6, положение 7 или положение 8) 5'-области антисмысловой цепи содержит 2'-метокси модификацию или химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию;

формула (I) выбрана из:



(I),

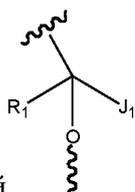
где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR<sub>4</sub>(R<sub>4</sub>'), S, NR<sub>5</sub> и NH-CO, где каждый R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub>' и R<sub>5</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

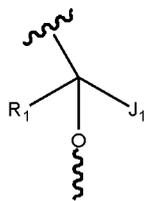
J<sub>2</sub> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

n = 0, 1 или 2; m = 0, 1 или 2; s = 0 или 1;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -O-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>R<sub>6</sub>, где R<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и p = 1, 2 или 3;



Q<sub>1</sub> представляет собой , и Q<sub>2</sub> представляет собой R<sub>2</sub>; или Q<sub>1</sub> представляет



собой R<sub>2</sub>, и Q<sub>2</sub> представляет собой  ;

где:

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила и (CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>R<sub>7</sub>, где R<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и q = 1, 2 или 3;

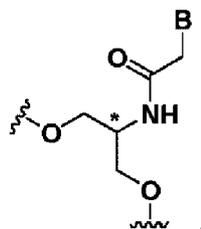
J<sub>1</sub> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -O-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>R<sub>8</sub>, где R<sub>8</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и r = 1, 2 или 3;

необязательно, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> непосредственно связаны с образованием кольца;

В представляет собой основание;

где химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация не



является

В некоторых вариантах осуществления, когда X представляет собой NH-CO, R<sub>1</sub> не представляет собой H.

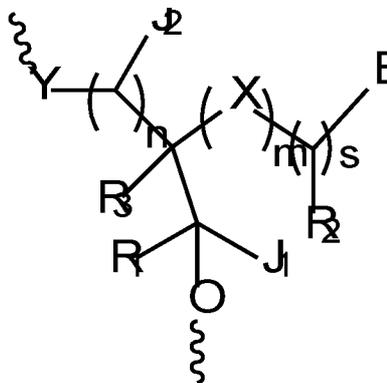
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления формула (I) выбрана из формулы (I-1):



(Формула I-1),

где:

Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из  $CR_4(R_4')$ , S,  $NR_5$  и  $NH-CO$ , где каждый  $R_4$ ,  $R_4'$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или  $C_1-C_6$  алкил;

каждый  $J_1$  и каждый  $J_2$  независимо представляет собой H или  $C_1-C_6$  алкил;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;  $m = 0, 1$  или  $2$ ;  $s = 0$  или  $1$ ;

$R_3$  выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена,  $NH_2$ ,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_1-C_6$  алкокси,  $C_2-C_6$  алкенила,  $C_2-C_6$  алкинила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-алкиламино и  $(CH_2)_pR_6$ , где  $R_6$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2-C_6$  алкенила и  $C_2-C_6$  алкинила, и  $p = 1, 2$  или  $3$ ;

$R_1$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_1-C_6$  алкокси,  $C_2-C_6$  алкенила,  $C_2-C_6$  алкинила и  $(CH_2)_qR_7$ , где  $R_7$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2-C_6$  алкенила и  $C_2-C_6$  алкинила, и  $q = 1, 2$  или  $3$ ;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена,  $NH_2$ ,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_1-C_6$  алкокси,  $C_2-C_6$  алкенила,  $C_2-C_6$  алкинила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-алкиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2-C_6$  алкенила и  $C_2-C_6$  алкинила, и  $r = 1, 2$  или  $3$ ;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых вариантах осуществления формулы (I-1) В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований,

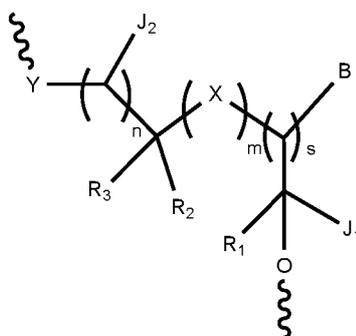
пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления формула (I) выбрана из формулы (I-2):



(I-2),

где,

Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR<sub>4</sub>(R<sub>4</sub>'), S, NR<sub>5</sub> и NH-CO, где каждый R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub>' и R<sub>5</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

n = 0, 1 или 2; m = 0, 1 или 2; s = 0 или 1;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -O-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>R<sub>6</sub>, где R<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и p = 1, 2 или 3;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила и (CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>R<sub>7</sub>, где R<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и q = 1, 2 или 3;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, S-CH<sub>3</sub>,

$\text{NCH}_3(\text{CH}_3)$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , -О-алкиламино и  $(\text{CH}_2)_r\text{R}_8$ , где  $\text{R}_8$  выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси, этокси,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкенила и  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкинила, и  $r = 1, 2$  или  $3$ ;

необязательно,  $\text{R}_1$  и  $\text{R}_2$  непосредственно связаны с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

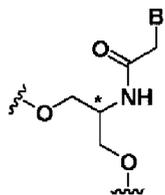
В некоторых вариантах осуществления формулы (I-2) В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина,  $\text{C}_2$ -модифицированного пурина,  $\text{N}8$ -модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина,  $\text{N}6$ -алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина,  $\text{C}5$ -модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация или ее таутомерная



модификация, описанная выше, не является

В некоторых вариантах осуществления каждый X независимо выбран из группы, состоящей из  $\text{CR}_4(\text{R}_4')$ , S,  $\text{NR}_5$  и  $\text{NH-CO}$ , где каждый из  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_4'$  и  $\text{R}_5$  независимо представляет собой H или  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкил;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;  $m = 0, 1$  или  $2$ ;  $s = 0$  или  $1$ ;

каждый  $\text{J}_1$  и каждый  $\text{J}_2$  независимо представляет собой H или  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкил;

$\text{R}_3$  выбран из группы, состоящей из H, ОН, галогена,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкила,  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкокси,  $\text{C}_2\text{-C}_4$  алкенила,  $\text{C}_2\text{-C}_4$  алкинила, S- $\text{CH}_3$ ,  $\text{NCH}_3(\text{CH}_3)$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , -О-алкиламино и  $(\text{CH}_2)_p\text{R}_6$ , где  $\text{R}_6$  выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси, этокси,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкенила и  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкинила, и  $p = 1, 2$  или  $3$ ;

$\text{R}_1$  выбран из группы, состоящей из H,  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкила,  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкокси,  $\text{C}_2\text{-C}_4$  алкенила,  $\text{C}_2\text{-C}_4$  алкинила и  $(\text{CH}_2)_q\text{R}_7$ , где  $\text{R}_7$  выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси,

этоксиды,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_4$  алкенилы и  $C_2$ - $C_4$  алкинилы, и  $q = 1, 2$  или  $3$ ;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из  $H$ ,  $OH$ , галогена,  $NH_2$ ,  $C_1$ - $C_3$  алкила,  $C_1$ - $C_3$  алкокси,  $C_2$ - $C_4$  алкенила,  $C_2$ - $C_4$  алкинила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ ,  $-O$ -алкиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из  $OH$ , галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_4$  алкенила и  $C_2$ - $C_4$  алкинила, и  $r = 1, 2$  или  $3$ ;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца.

$B$  является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых вариантах осуществления  $B$  представляет собой основание; например,  $B$  выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления  $B$  выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина,  $C2$ -модифицированного пурина,  $N8$ -модифицированного пурина, 2,6-диаминопурин, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурин,  $N6$ -алкиладенина,  $O6$ -алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина,  $C5$ -модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления  $B$  выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурин, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурин, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления  $B$  представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления каждый  $X$  независимо выбран из группы, состоящей из  $CR_4(R_4')$ ,  $S$ ,  $NR_5$  и  $NH-CO$ , где каждый  $R_4$ ,  $R_4'$  и  $R_5$  независимо представляет собой  $H$ , метил, этил,  $n$ -пропил или изопропил;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;  $m = 0, 1$  или  $2$ ;  $s = 0$  или  $1$ ;

каждый  $J_1$  и каждый  $J_2$  независимо представляет собой  $H$  или метил;

$R_3$  выбран из группы, состоящей из  $H$ ,  $OH$ ,  $F$ ,  $Cl$ ,  $NH_2$ , метила, этила,  $n$ -пропила, изопропила, метокси, этокси,  $n$ -пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ ,  $-O$ -метиламино,  $-O$ -этиламино и  $(CH_2)_pR_6$ , где  $R_6$  выбран из группы, состоящей из  $OH$ ,  $F$ ,  $Cl$ , метокси, этокси,  $N_3$ , винила, аллила, этинила и пропаргила, и  $p = 1$  или  $2$ ;

$R_1$  выбран из группы, состоящей из  $H$ , метила, этила,  $n$ -пропила, изопропила, метокси, этокси,  $n$ -пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила и  $(CH_2)_qR_7$ , где  $R_7$  выбран из группы, состоящей из  $OH$ ,  $F$ ,  $Cl$ , метокси, этокси,  $N_3$ , винила, аллила, этинила и пропаргила, и  $q = 1$  или  $2$ ;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl,  $NH_2$ , метила, этила, н-пропила, изопропила, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила, S- $CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-метиламино, -O-этиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси,  $N_3$ , винила, аллила, этинила и пропаргила, и  $r = 1$  или 2;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца.

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в

положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH<sub>2</sub> и NH;

n = 0 или 1; m = 0 или 1; s = 0 или 1;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой H;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, NH<sub>2</sub>, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, NH<sub>2</sub>, метила и CH<sub>2</sub>OH;

необязательно, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> непосредственно связаны с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH<sub>2</sub> и NH;

n = 0 или 1; m = 0 или 1; s = 0 или 1;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой H;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, NH<sub>2</sub>, метила и CH<sub>2</sub>OH;

необязательно, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> непосредственно связаны с образованием кольца.

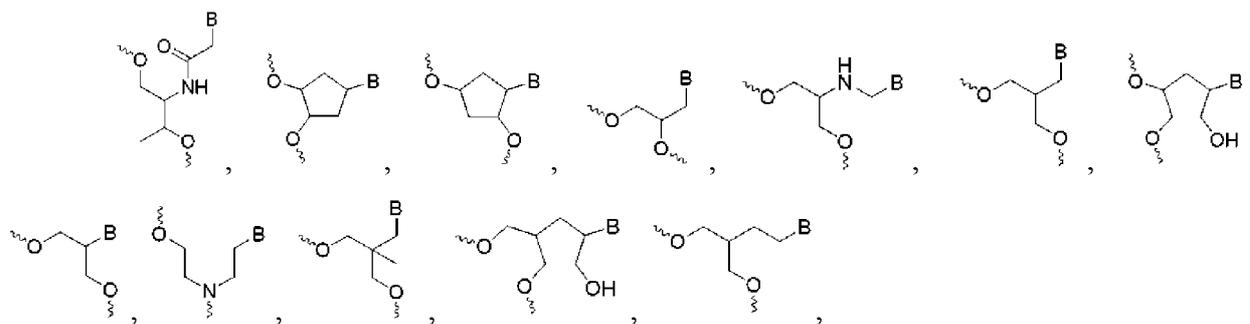
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

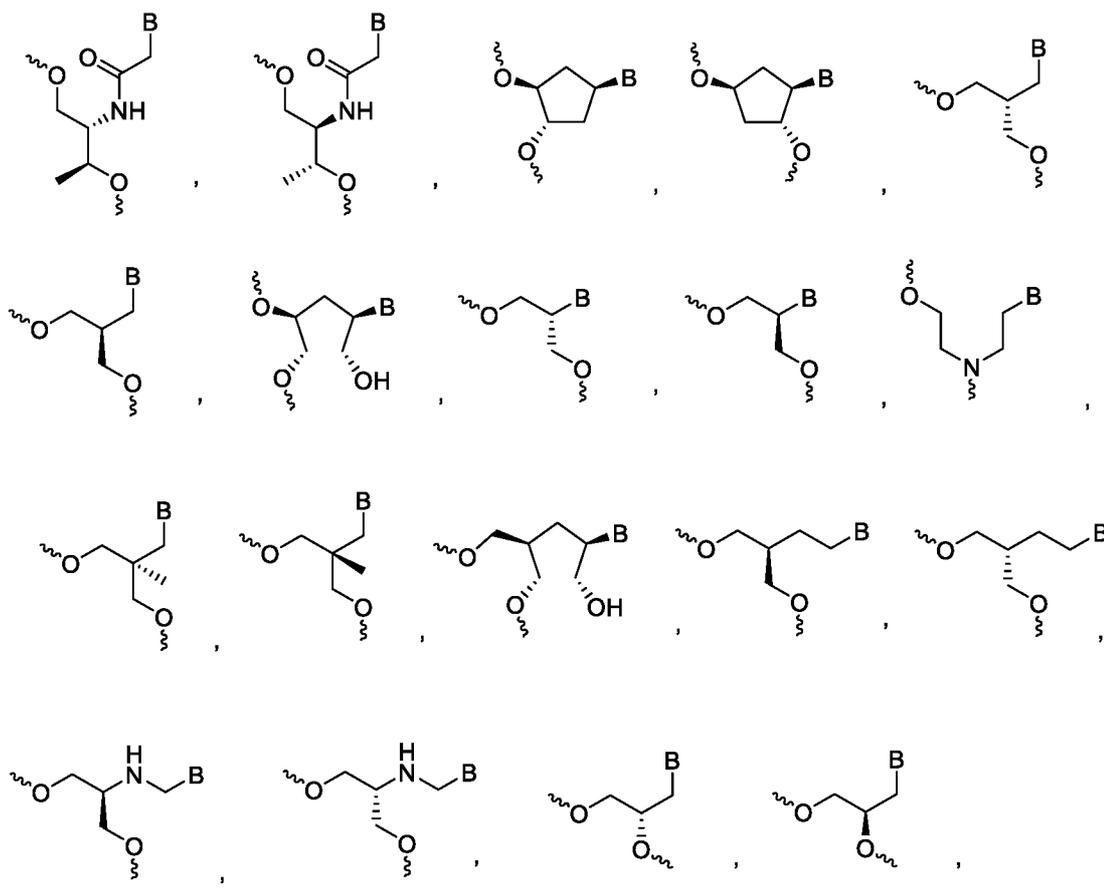
В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления в некоторых вариантах осуществления химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация выбрана из группы, состоящей из:





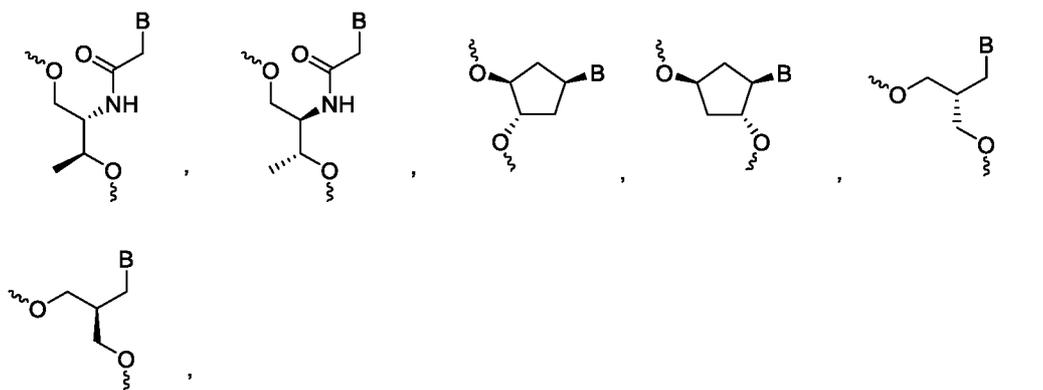
где В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация выбрана из группы, состоящей из:



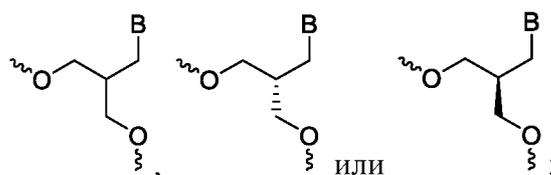
представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация выбрана из группы, состоящей из:



где В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления изобретения В представляет собой основание в соответствующем положении среди положений 2-8 5'-области антисмысловой цепи.

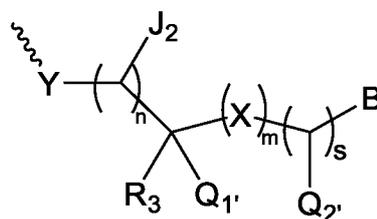
В некоторых вариантах осуществления, когда химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация находится в положении 5 5'-области, В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола. В

некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 5 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, когда химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация находится в положении 6 5'-области, В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола. В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 6 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, когда химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация находится в положении 7 5'-области, В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола. В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию выбран из нуклеотида, содержащего химическую модификацию формулы (I') или ее таутомерную модификацию,



(I'),

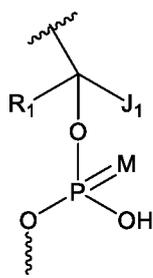
где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

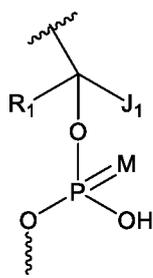
каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR<sub>4</sub>(R<sub>4</sub>'), S, NR<sub>5</sub> и NH-CO, где каждый R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub>' и R<sub>5</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

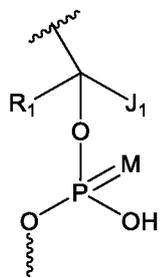
J<sub>2</sub> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

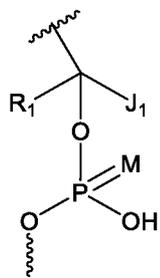
n = 0, 1 или 2; m = 0, 1 или 2; s = 0 или 1;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -O-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>R<sub>6</sub>, где R<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и p = 1, 2 или 3;



$Q_1'$  представляет собой , и  $Q_2'$  представляет собой  $R_2$ ; или  $Q_1'$  представляет



собой  $R_2$ , и  $Q_2'$  представляет собой  ;

где:

$R_1$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1$ - $C_6$  алкила,  $C_1$ - $C_6$  алкокси,  $C_2$ - $C_6$  алкенила,  $C_2$ - $C_6$  алкинила и  $(CH_2)_qR_7$ , где  $R_7$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_6$  алкенила и  $C_2$ - $C_6$  алкинила, и  $q = 1, 2$  или  $3$ ;

$J_1$  представляет собой H или  $C_1$ - $C_6$  алкил;

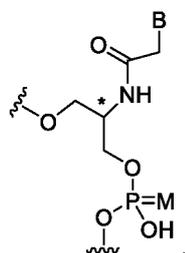
$R_2$  выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена,  $NH_2$ ,  $C_1$ - $C_6$  алкила,  $C_1$ - $C_6$  алкокси,  $C_2$ - $C_6$  алкенила,  $C_2$ - $C_6$  алкинила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-алкиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_6$  алкенила и  $C_2$ - $C_6$  алкинила, и  $r = 1, 2$  или  $3$ ;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца;

$B$  представляет собой основание;

$M$  представляет собой O или S;

где химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация не



является

В некоторых вариантах осуществления, когда  $X$  представляет собой  $NH-CO$ ,  $R_1$  не представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I')  $B$  представляет собой основание; например,  $B$  выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

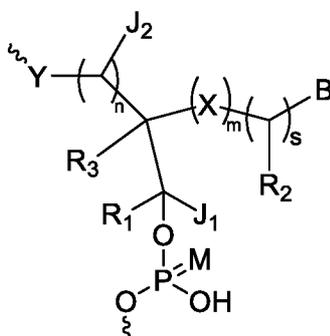
В некоторых вариантах осуществления  $B$  выбран из группы, состоящей из аденина,

гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления формула (I') выбрана из формулы (I'-1):



(I'-1),

где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR<sub>4</sub>(R<sub>4</sub>'), S, NR<sub>5</sub> и NH-CO, где каждый R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub>' и R<sub>5</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

n = 0, 1 или 2; m = 0, 1 или 2; s = 0 или 1;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -O-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>R<sub>6</sub>, где R<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и p = 1, 2 или 3;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила и (CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>R<sub>7</sub>, где R<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и q = 1, 2 или 3;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -O-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>R<sub>8</sub>, где R<sub>8</sub> выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, и r = 1, 2 или 3;

М представляет собой О или S;

необязательно, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> непосредственно связаны с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I').

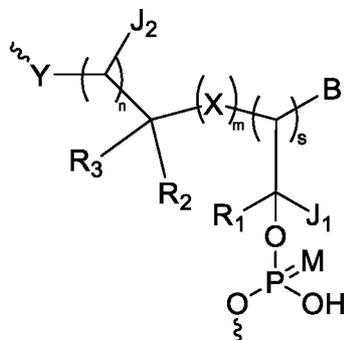
В некоторых вариантах осуществления формулы (I'-1) В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления формула (I') выбрана из формулы (I'-2):



(I'-2),

где Y выбран из группы, состоящей из О, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR<sub>4</sub>(R<sub>4</sub>'), S, NR<sub>5</sub> и NH-CO, где каждый R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub>' и R<sub>5</sub> независимо представляет собой Н или С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкил;

n = 0, 1 или 2; m = 0, 1 или 2; s = 0 или 1;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой Н или С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкил;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из Н, ОН, галогена, NH<sub>2</sub>, С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкила, С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкокси, С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub> алкенила, С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub> алкинила, S-CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -О-алкиламино и (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>R<sub>6</sub>, где R<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси, этокси, N<sub>3</sub>, С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub> алкенила и С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub> алкинила, и p = 1, 2 или 3;

$R_1$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_1-C_6$  алкокси,  $C_2-C_6$  алкенила,  $C_2-C_6$  алкинила и  $(CH_2)_qR_7$ , где  $R_7$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2-C_6$  алкенила и  $C_2-C_6$  алкинила, и  $q = 1, 2$  или  $3$ ;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_1-C_6$  алкокси,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-алкиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2-C_6$  алкенила и  $C_2-C_6$  алкинила, и  $r = 1, 2$  или  $3$ ;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца;

M представляет собой O или S;

V является таким, как определено в формуле (I').

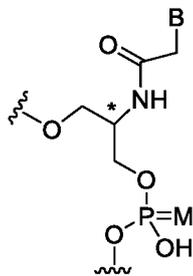
В некоторых вариантах осуществления формулы (I'-2) V представляет собой основание; например, V выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления V выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления V выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления V представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация или ее таутомерная



модификация, описанная выше, не является

В некоторых вариантах осуществления, когда X представляет собой NH-CO,  $R_1$  не представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления каждый X независимо выбран из группы, состоящей из  $CR_4(R_4')$ , S,  $NR_5$  и NH-CO, где каждый из  $R_4$ ,  $R_4'$  и  $R_5$  независимо представляет собой H или  $C_1-C_3$  алкил;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;  $m = 0, 1$  или  $2$ ;  $s = 0$  или  $1$ ;

каждый  $J_1$  и каждый  $J_2$  независимо представляет собой H или  $C_1$ - $C_3$  алкил;

$R_3$  выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена,  $NH_2$ ,  $C_1$ - $C_3$  алкила,  $C_1$ - $C_3$  алкокси,  $C_2$ - $C_4$  алкенила,  $C_2$ - $C_4$  алкинила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-алкиламино и  $(CH_2)_pR_6$ , где  $R_6$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_6$  алкенила и  $C_2$ - $C_6$  алкинила, и  $p = 1, 2$  или  $3$ ;

$R_1$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1$ - $C_3$  алкила,  $C_1$ - $C_3$  алкокси,  $C_2$ - $C_4$  алкенила,  $C_2$ - $C_4$  алкинила и  $(CH_2)_qR_7$ , где  $R_7$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_4$  алкенила и  $C_2$ - $C_4$  алкинила, и  $q = 1, 2$  или  $3$ ;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена,  $NH_2$ ,  $C_1$ - $C_3$  алкила,  $C_1$ - $C_3$  алкокси,  $C_2$ - $C_4$  алкенила,  $C_2$ - $C_4$  алкинила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-алкиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси,  $N_3$ ,  $C_2$ - $C_4$  алкенила и  $C_2$ - $C_4$  алкинила, и  $r = 1, 2$  или  $3$ ;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца.

В некоторых вариантах осуществления каждый X независимо выбран из группы, состоящей из  $CR_4(R_4')$ , S,  $NR_5$  и  $NH-CO$ , где каждый  $R_4$ ,  $R_4'$  и  $R_5$  независимо представляет собой H, метил, этил, н-пропил или изопропил;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;  $m = 0, 1$  или  $2$ ;  $s = 0$  или  $1$ ;

каждый  $J_1$  и каждый  $J_2$  независимо представляет собой H или метил;

$R_3$  выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl,  $NH_2$ , метила, этила, н-пропила, изопропила, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-метиламино, -O-этиламино и  $(CH_2)_pR_6$ , где  $R_6$  выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси,  $N_3$ , винила, аллила, этинила и пропаргила, и  $p = 1$  или  $2$ ;

$R_1$  выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, н-пропила, изопропила, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила и  $(CH_2)_qR_7$ , где  $R_7$  выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси,  $N_3$ , винила, аллила, этинила и пропаргила, и  $q = 1$  или  $2$ ;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl,  $NH_2$ , метила, этила, н-пропила, изопропила, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила,  $S-CH_3$ ,  $NCH_3(CH_3)$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ , -O-метиламино, -O-этиламино и  $(CH_2)_rR_8$ , где  $R_8$  выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси,  $N_3$ , винила, аллила, этинила и пропаргила, и  $r = 1$  или  $2$ ;

необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например,

В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH<sub>2</sub> и NH;

$n = 0$  или  $1$ ;  $m = 0$  или  $1$ ;  $s = 0$  или  $1$ ;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой H;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, NH<sub>2</sub>, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, NH<sub>2</sub>, метила и CH<sub>2</sub>OH;

необязательно, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> непосредственно связаны с образованием кольца.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH<sub>2</sub> и NH;

n = 0 или 1; m = 0 или 1; s = 0 или 1;

каждый J<sub>1</sub> и каждый J<sub>2</sub> независимо представляет собой H;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, метила и CH<sub>2</sub>OH;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, OH, NH<sub>2</sub>, метила и CH<sub>2</sub>OH;

необязательно, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> непосредственно связаны с образованием кольца.

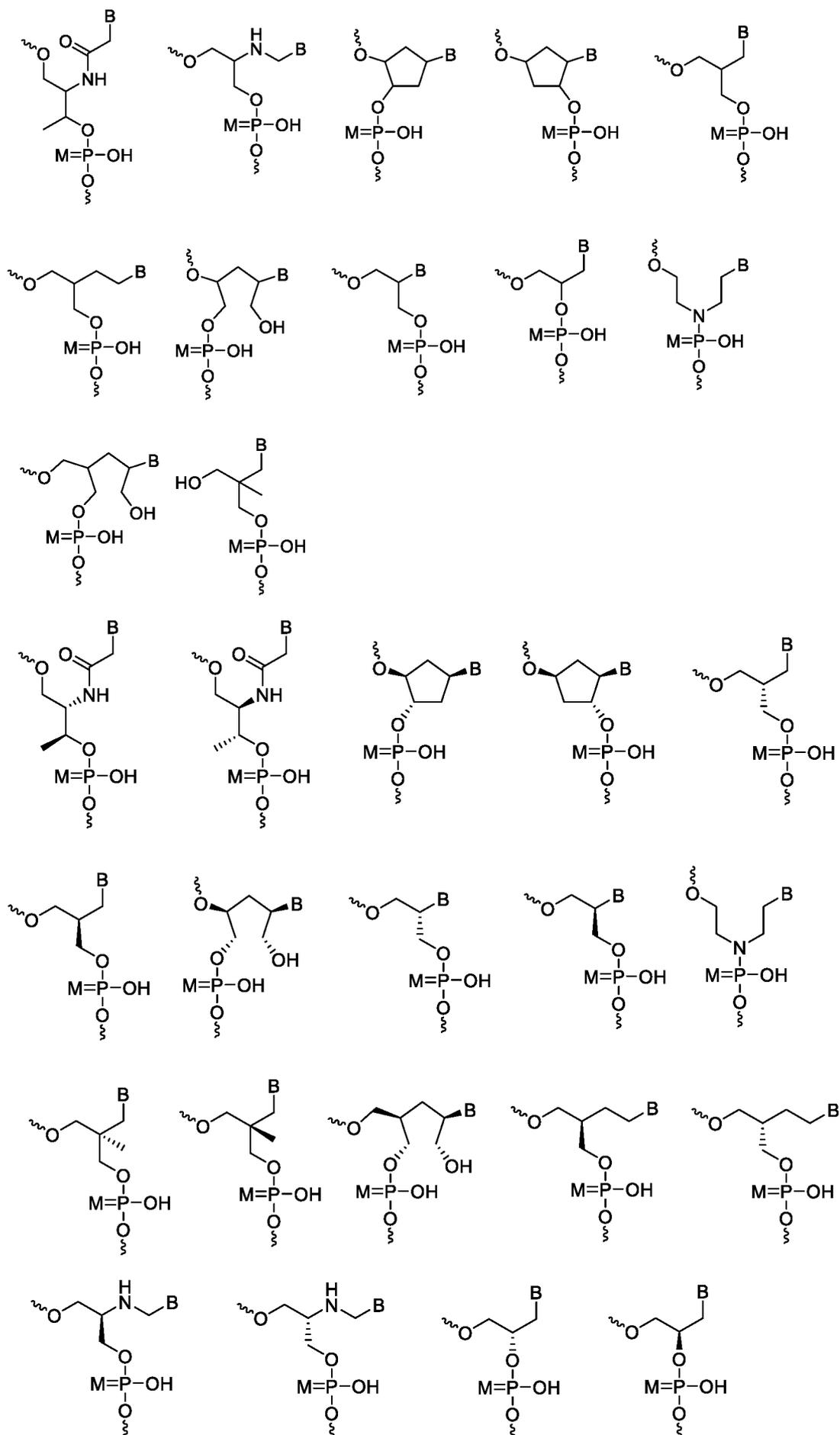
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация выбрана из группы, состоящей из:



где М представляет собой О или S;

В является таким, как определено в формуле (I').

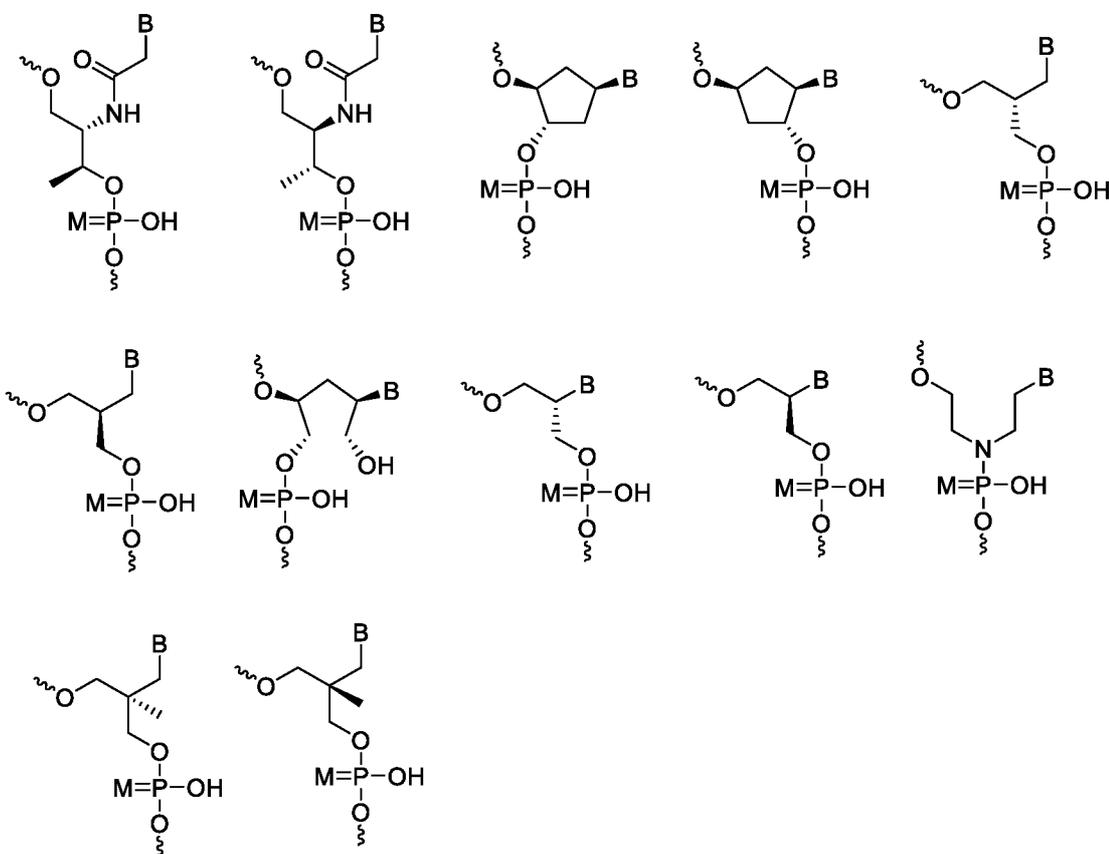
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация выбрана из группы, состоящей из:



где М представляет собой О или S;

В является таким, как определено в формуле (I').

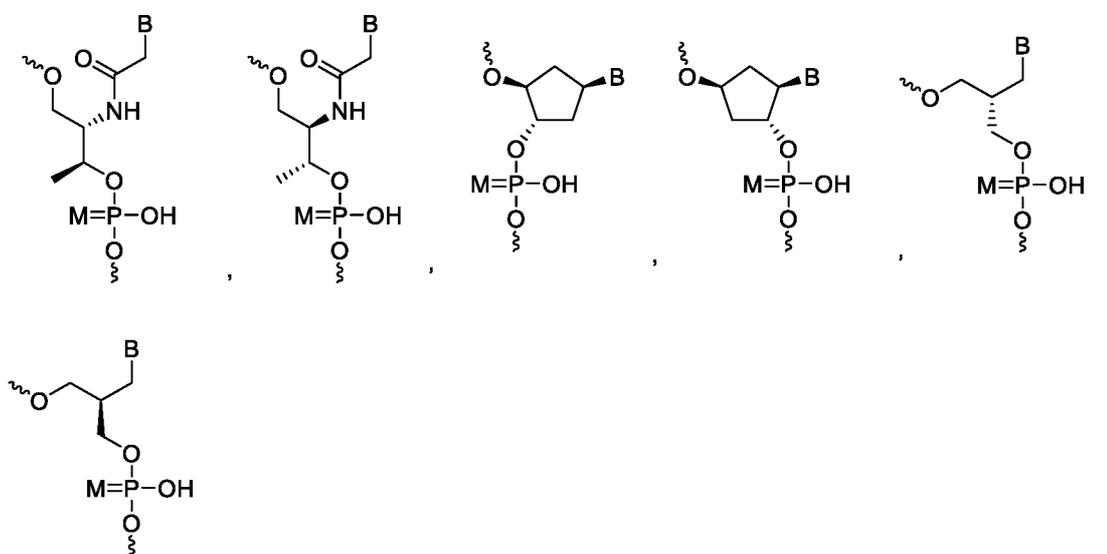
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация выбрана из группы, состоящей из:



где М представляет собой О или S;

В является таким, как определено в формуле (I').

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание; например, В выбран из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

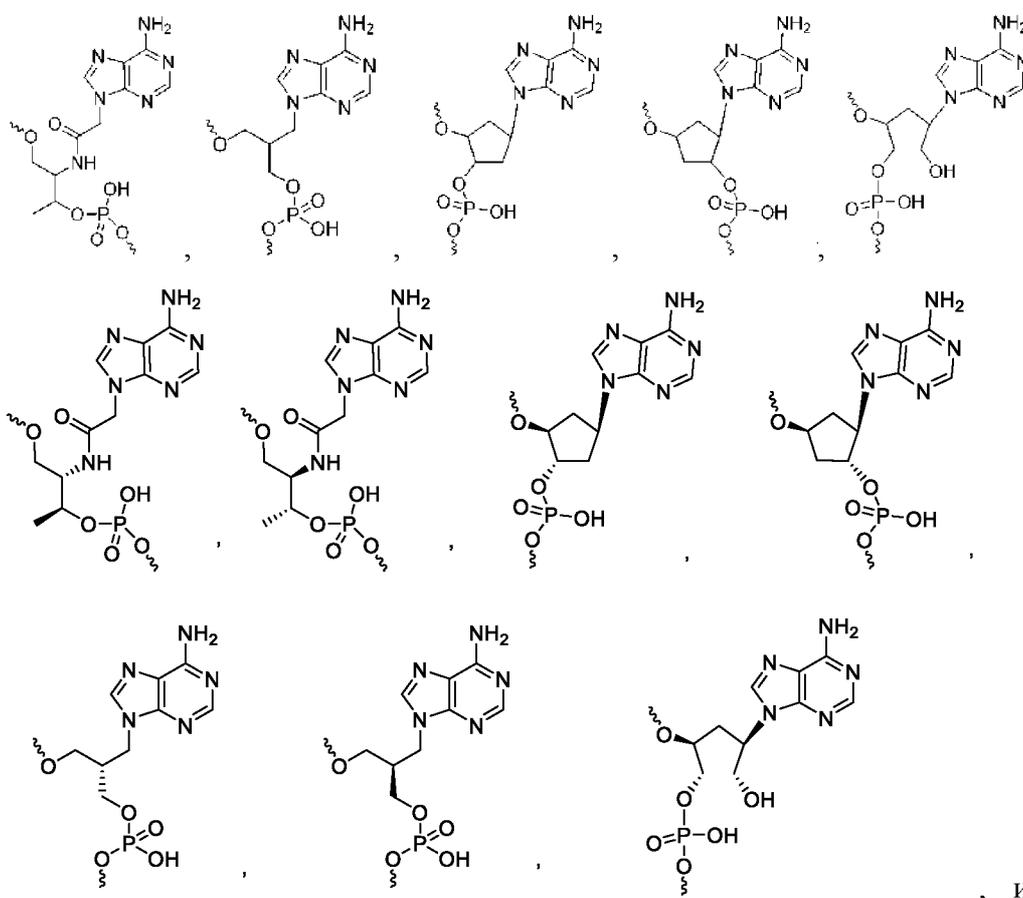
В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина,

№6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание в положении, соответствующем модифицированному нуклеотиду антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация включает, но не ограничивается ими:



аденин в структуре замещен гуанином, цитозином, урацилом или тиминном.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид в положениях 2-8 (например, положение 2, положение 3, положение 4, положение 5, положение 6, положение 7 или положение 8) 5'-области антисмысловой цепи содержит 2'-метокси модификацию.

В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеотидов в положениях 5, 6 и 7 5'-области антисмысловой цепи содержит 2'-метокси модификацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный нуклеотид

расположен в любом из положений 2-8 5' -области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный нуклеотид расположен в любом из положений 5, 6 или 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, когда химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация находится в положении 5 5'-области, В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола; в некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 5 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, когда химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация находится в положении 6 5'-области, В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола; в некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 6 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, когда химическая модификация формулы (I') или ее таутомерная модификация находится в положении 7 5'-области, В выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола; в некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный нуклеотид в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи миРНК представляет собой модифицированный нуклеотид, выбранный из группы, состоящей из: 2'-метокси-модифицированного нуклеотида, 2'-замещенного алкокси-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-замещенного алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-замещенного аминоксидированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 3'-дезокситиминового нуклеотида, изонуклеотида, LNA (заблокированная нуклеиновая кислота), ENA (нуклеиновая кислота с этиленовыми мостиками), сЕТ (нуклеиновая кислота с затрудненным этилом), UNA (незаблокированная нуклеиновая кислота) и GNA (гликолевая нуклеиновая кислота). В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды, модифицированные другим образом, независимо выбраны из группы, состоящей из 2'-метокси-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида и 2'-



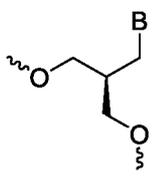
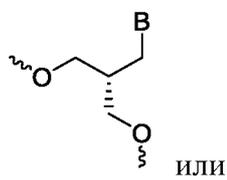
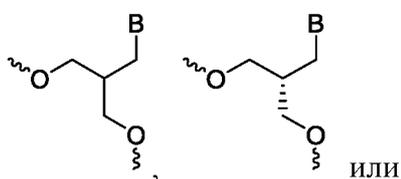
нуклеотидную последовательность формулы, приведенной ниже:



где  $N_a'$  представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, и  $N_b'$  представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;  $W'$  представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид или нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию.

В некоторых конкретных вариантах осуществления  $W'$  представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию.

В некоторых конкретных вариантах осуществления формула (I) выбрана из группы, состоящей из:

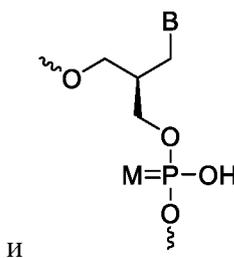
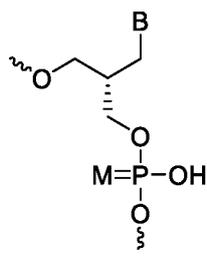
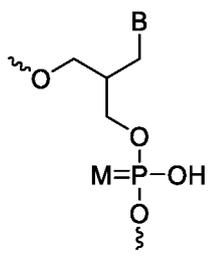


или

;

где  $B$  выбран из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых конкретных вариантах осуществления  $B$  выбран из основания, соответствующего положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых конкретных вариантах осуществления формула (I) выбрана из группы, состоящей из:



и

;

где  $M$  представляет собой  $O$  или  $S$ ; где  $B$  выбран из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых конкретных вариантах осуществления  $B$  выбран из основания, соответствующего положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых конкретных вариантах осуществления  $M$  представляет собой  $S$ . В некоторых конкретных вариантах осуществления  $M$  представляет собой  $O$ .

В некоторых конкретных вариантах осуществления  $W'$  представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна сложная фосфоэфирная группа в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи представляет собой

сложную фосфоэфирную группу с группой модификации. Модифицирующая группа делает миРНК более стабильной в биологическом образце или среде. В некоторых вариантах осуществления изобретения сложная фосфоэфирная группа с группой модификации представляет собой фосфоротиоатную группу.

В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная группа присутствует по меньшей мере в одном из положений, выбранных из группы, состоящей из:

- положение между 1-м и 2-м нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи;
- положение между 2-м и 3-м нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи;
- конец 1-го нуклеотида 3'-конца смысловой цепи;
- положение между 1-м и 2-м нуклеотидами 3'-конца смысловой цепи;
- положение между 2-м и 3-м нуклеотидами 3'-конца смысловой цепи;
- положение между 1-м и 2-м нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи;
- положение между 2-м и 3-м нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи;
- конец 1-го нуклеотида 3'-конца антисмысловой цепи;
- положение между 1-м и 2-м нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи; и
- положение между 2-м и 3-м нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь содержат множество фосфоротиоатных групп, которые присутствуют:

- между 1-м и 2-м нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи; и
- между 2-м и 3-м нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи; и
- между 1-м и 2-м нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи; и
- между 2-м и 3-м нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи; и
- между 1-м и 2-м нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи; и
- между 2-м и 3-м нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность формулы, приведенной ниже:

- 5'-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNm-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNm-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNms-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNms-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNm-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNm-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNms-3', или
- 5'-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNms-3',

где Nm представляет собой любой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, такой

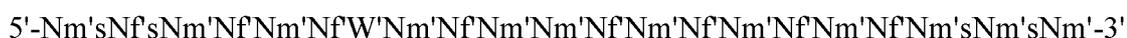
как 2'-метокси-модифицированный C, G, U или A; Nf представляет собой любой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-фтор-модифицированный C, G, U или A;

строчные буквы s указывают, что два нуклеотида, смежные с буквами s, связаны фосфотиоатной группой; строчные буквы s, когда они являются первыми на 3'-конце, указывают, что расположенная выше сложная фосфоэфирная группа, смежная с буквой s, представляет собой фосфотиоатную группу.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность формулы, приведенной ниже:



или

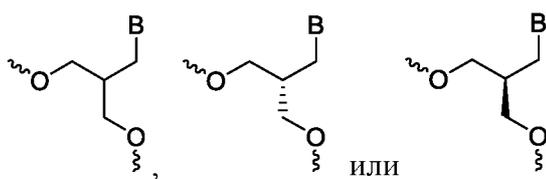


где Nm' представляет собой любой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-метокси-модифицированный C, G, U или A; Nf' представляет собой любой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-фтор-модифицированный C, G, U или A;

строчные буквы s указывают, что два нуклеотида, смежные с буквами s, связаны фосфотиоатной группой; строчные буквы s, когда они являются первыми на 3'-конце, указывают, что расположенная выше сложная фосфоэфирная группа, смежная с буквой s, представляет собой фосфотиоатную группу;

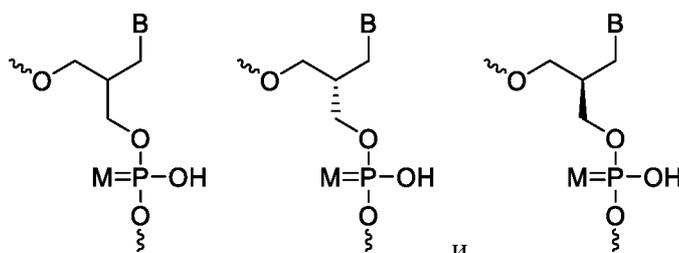
W' представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид или нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления формула (I) выбрана из группы, состоящей из:



или ; где B выбран из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых вариантах осуществления B представляет собой основание, соответствующее положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления формула (I) выбрана из группы, состоящей из:



; где М представляет собой О или S; где В выбран из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых конкретных вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых конкретных вариантах осуществления М представляет собой S. В некоторых конкретных вариантах осуществления М представляет собой О.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, и содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов.

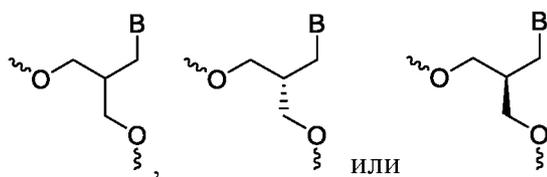
В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6, и содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность отличается не более чем на 1 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 13 до SEQ ID NO: 18, и содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность отличается не более чем на 1 нуклеотид; где W' представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид или нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид смысловой цепи выбран из любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6.

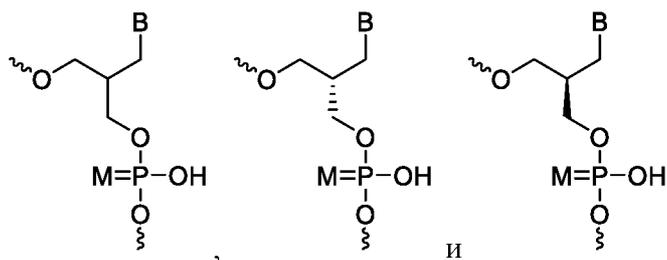
В некоторых вариантах осуществления нуклеотид антисмысловой цепи выбран из любой из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 18, где W' представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид или нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления формула (I) выбрана из группы, состоящей из:



или ; где В выбран из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления формула (I) выбрана из группы, состоящей из:



; где М представляет собой О или S; где В выбран из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина и урацила; в некоторых конкретных вариантах осуществления В представляет собой основание, соответствующее положению 7 5'-области антисмысловой цепи.

В некоторых конкретных вариантах осуществления М представляет собой S. В некоторых конкретных вариантах осуществления М представляет собой O.

В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая цепь содержит любую из SEQ ID NO: 135 - SEQ ID NO: 162.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит любую из SEQ ID NO: 189 - SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 243 - SEQ ID NO: 259 и SEQ ID NO: 273 - SEQ ID NO: 289.

В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 135 - SEQ ID NO: 162;

в некоторых конкретных вариантах осуществления антисмысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 189 - SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 243 - SEQ ID NO: 259 и SEQ ID NO: 273 - SEQ ID NO: 289.

В некоторых конкретных вариантах осуществления миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, выбранную из любой из тех, которые показаны в Таблице 26.

В некоторых конкретных вариантах осуществления миРНК согласно настоящему изобретению выбрана из любого из следующего:

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 140, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 194; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 143, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 197; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 144, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 199; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 146, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 200; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 147, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 201; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 148, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 202; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 149, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 203; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 150, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 204; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 151, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 205; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 152, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 206; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 153, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 207; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 154, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 208; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 155, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 209; или

миРНК по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 156, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 210.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату миРНК, который содержит любую миРНК, описанную выше, и нацеливающий лиганд, связанный с миРНК.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит нацеливающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления миРНК и нацеливающий лиганд связаны ковалентно или нековалентно.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд нацелен на печень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связывается с рецептором азиалогликопротеина (ASGPR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий

лиганд включает группа галактозы или группа производных галактозы. Производное галактозы выбрано из группы, состоящей из N-ацетил-галактозамина, N-трифторацетил-галактозамина, N-пропионил-галактозамина, N-н-бутирилгалактозамина и N-изобутирилгалактозамина.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан с 3'-концом смысловой цепи миРНК.

В некоторых вариантах осуществления для содействия проникновению миРНК в клетку липофильная группа, такая как холестерин, может быть введена в конец смысловой цепи миРНК. Липофильная группа ковалентно связана с миРНК, например, холестерин, липопротеин, витамин E и т.д., введены в конец, чтобы облегчить прохождение через клеточную мембрану, состоящую из липидного бислоя и взаимодействие с мРНК в клетке. Между тем, миРНК также может быть модифицирована нековалентным связыванием, например, связыванием с фосфолипидной молекулой, полипептидом, катионным полимером и т.д., гидрофобной связью или ионной связью для повышения стабильности и биологической активности.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан с концом миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы, фосфоротиоатной группы или группы фосфоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд косвенно связан с концом миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы, фосфоротиоатной группы или группы фосфоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд непосредственно связан с концом миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы, фосфоротиоатной группы или группы фосфоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд непосредственно связан с концом миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы или фосфоротиоатной группы. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд непосредственно связан с 3'-концом смысловой цепи миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы или фосфоротиоатной группы.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд помогает направлять доставку терапевтического агента, связанного с ним, в желаемое целевое положение. В некоторых случаях нацеливающий фрагмент может связываться с клеткой или клеточным рецептором и инициировать эндоцитоз для облегчения проникновения терапевтического агента в клетку. Нацеливающий фрагмент может содержать соединение с аффинностью к клеточному рецептору или молекуле клеточной поверхности. Различные нацеливающие лиганды, содержащие нацеливающие фрагменты, могут быть связаны с терапевтическими агентами и другими соединениями для нацеливания агентов на клетки и конкретные

клеточные рецепторы.

В некоторых вариантах осуществления типы нацеливающих фрагментов включают углеводы, холестерин и группы холестерина или стероиды. Нацеливающие фрагменты, которые могут связываться с клеточными рецепторами, включают сахараиды, такие как галактоза, производные галактозы (например, N-ацетил-галактозамин, N-трифторацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутирилгалактозамин и N-изобутирилгалактозамин), манноза и производные маннозы.

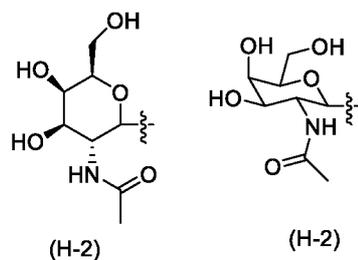
Известно, что нацеливающие фрагменты, которые связываются с азиалогликопротеиновыми рецепторами (ASGPR), в частности, могут быть использованы для направления доставки олигомерных соединений (например, мРНК или ее конъюгата или дцРНК) в печень. Азиалогликопротеиновые рецепторы широко экспрессируются на клетках печени. Нацеливающие фрагменты клеточных рецепторов, нацеленных на ASCPR, включают галактозу и производные галактозы. В частности, группы производных галактозы, включая группы, состоящие из 2, 3, 4 или более 4 N-ацетил-галактозаминов (GalNAc или NAG), могут способствовать поглощению определенных соединений гепатоцитами. Группа GalNAc, связанная с олигомерным соединением, используется для направления терапевтического агента в печень, и сахарид N-ацетил-галактозамин может связываться с рецепторами азиалогликопротеина на поверхности клеток печени. Считается, что связывание с рецепторами азиалогликопротеина инициирует рецептор-опосредованный эндоцитоз, тем самым способствуя проникновению терапевтического агента внутрь клетки.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд может содержать 2, 3, 4 или более 4 нацеливающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, может содержать 1, 2, 3, 4 или более 4 нацеливающих фрагментов, связанных с группой ветвления L2.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд находится в форме группы галактозы.

В некоторых вариантах осуществления каждый нацеливающий фрагмент независимо представляет собой производное галактозамина, которое представляет собой N-ацетил-галактозамин. Другие сахара, которые могут быть использованы в качестве нацеливающих фрагментов и которые имеют аффинность к рецепторам асиалогликопротеина, могут быть выбраны из группы, состоящей из галактозы, галактозамина, N-формил-галактозамина, N-пропионил-галактозамина, N-н-бутирил-галактозамина, N-изобутирил-галактозамина и т.д.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд в настоящем описании содержит N-ацетилгалактозамин в качестве нацеливающего фрагмента,



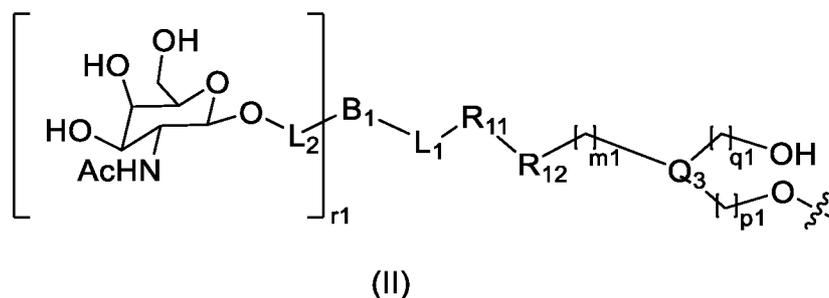
В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит три терминальных галактозамина или производных галактозамина (такие как N-ацетил-галактозамин), каждый из которых обладает сродством к рецепторам асиалогликопротеина. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит три терминальных N-ацетил-галактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит четыре терминальных галактозамина или производных галактозамина (такие как N-ацетил-галактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к рецепторам асиалогликопротеина. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит четыре терминальных N-ацетил-галактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов.

Термины, обычно используемые в данной области техники применительно к трем концевым N-ацетилгалактозаминам, включают триантенные, трехвалентные и тримерные.

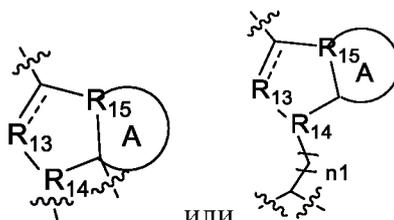
Термины, обычно используемые в данной области техники применительно к четырем концевым N-ацетилгалактозаминам, включают тетраантенный, четырехвалентный и тетрамерный.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из соединения формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли,



где L<sub>1</sub> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> алкильную цепь или содержит C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или C=O;

R<sub>11</sub> и R<sub>12</sub> независимо представляют собой химические связи, NR<sub>16</sub>, C=O или -OC(=O)-;



Q<sub>3</sub> представляет собой  или  ;

 представляет собой одинарную связь или двойную связь, и когда  представляет собой одинарную связь, R<sub>13</sub> независимо представляет собой CR<sub>17</sub>R<sub>18</sub>, NR<sub>16</sub>, O или S;

когда  представляет собой двойную связь, R<sub>13</sub> независимо представляет собой CR<sub>19</sub> или N;

R<sub>14</sub> независимо представляет собой CR<sub>19</sub> или N;

кольцо A представляет собой циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, который присутствует или отсутствует, и когда кольцо A присутствует, R<sub>15</sub> независимо представляет собой CR<sub>19</sub> или N; когда кольцо A отсутствует, R<sub>15</sub> независимо представляет собой CR<sub>17</sub>R<sub>18</sub>, NR<sub>16</sub> или O;

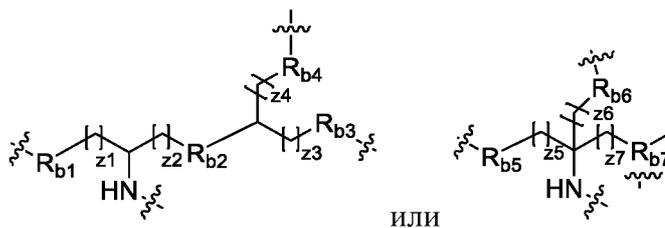
R<sub>16</sub> и R<sub>19</sub> независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил, SR', S(=O)R', S(=O)<sub>2</sub>R', S(=O)<sub>2</sub>NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' или C(=O)NR'(R''), где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро-, циано-, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>3-7</sub> циклоалкила, 3-12-членного гетероциклоалкила, 6-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR', S(=O)R', S(=O)<sub>2</sub>R', S(=O)<sub>2</sub>NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' и C(=O)NR'(R'');

R<sub>17</sub> и R<sub>18</sub> независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил, SR', S(=O)R', S(=O)<sub>2</sub>R', S(=O)<sub>2</sub>NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' или C(=O)NR'(R''), где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро-, циано-, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>3-7</sub> циклоалкила, 3-12-членного гетероциклоалкила, 6-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR', S(=O)R', S(=O)<sub>2</sub>R', S(=O)<sub>2</sub>NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' и C(=O)NR'(R'');

R' и R'' независимо представляют собой водород, дейтерий, гидроксигруппу, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро- и

циано;

$m_1$ ,  $n_1$ ,  $p_1$  и  $q_1$  независимо представляют собой 0, 1, 2, 3 или 4;



$V_1$  представляет собой

или

$R_{b1}$ ,  $R_{b2}$ ,  $R_{b3}$ ,  $R_{b4}$ ,  $R_{b5}$ ,  $R_{b6}$  и  $R_{b7}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-$ ,  $-NHC(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$  или  $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ;

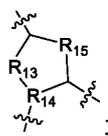
$z_1$ ,  $z_2$ ,  $z_3$ ,  $z_4$ ,  $z_5$ ,  $z_6$ ,  $z_7$ ,  $z_8$  и  $z_9$  независимо представляют собой целые числа от 0 до 10;

$L_2$  представляет собой  $C_1-C_{30}$  алкильную цепь или содержит  $C_1-C_{30}$  алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или  $C=O$ ;

$r_1$  представляет собой целое число от 1 до 10.

В некоторых вариантах осуществления  $L_1$  представляет собой  $C_1-C_{30}$  алкильную цепь или содержит  $C_1-C_{30}$  алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или  $C=O$ ;

$R_{11}$  и  $R_{12}$  независимо представляют собой химические связи,  $NR_{16}$  или  $C=O$ ;



$Q_3$  представляет собой

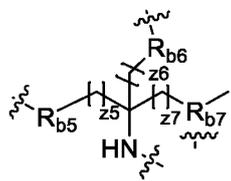
$R_{13}$  представляет собой  $CR_{17}R_{18}$ ,  $NR_{16}$ ,  $O$  или  $S$ ;

$R_{14}$  представляет собой  $CR_{19}$ ;

$R_{15}$  независимо представляет собой  $CR_{17}R_{18}$ ,  $NR_{16}$  или  $O$ ;

$R_{16}-R_{19}$  независимо представляют собой водород, дейтерий или алкил;

$m_1$ ,  $p_1$  и  $q_1$  независимо представляют собой 0, 1, 2, 3 или 4;



$V_1$  представляет собой

$R_{b5}$ ,  $R_{b6}$  и  $R_{b7}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-$ ,  $-NHC(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$  или  $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ;

$z_5$ ,  $z_6$ ,  $z_7$ ,  $z_8$  и  $z_9$  независимо представляют собой целые числа от 0 до 10;

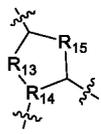
$L_2$  представляет собой  $C_1-C_{30}$  алкильную цепь или содержит  $C_1-C_{30}$  алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или  $C=O$ ;

$r_1$  представляет собой целое число от 1 до 10.

В некоторых вариантах осуществления  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_{j11}-C(=O)-(CH_2)_{j12}-$ ;

$R_{11}$  и  $R_{12}$  независимо представляют собой химические связи,  $NR_{16}$  или  $C=O$ ;

$R_{16}$  представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил;



$Q_3$  представляет собой ;

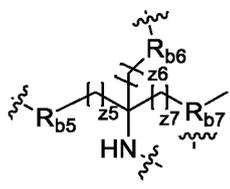
$R_{13}$  представляет собой  $CR_{17}R_{18}$  или  $O$ ;

$R_{14}$  представляет собой  $CR_{19}$ ;

$R_{15}$  независимо представляет собой  $CR_{17}R_{18}$  или  $O$ ;

$R_{17}-R_{19}$  независимо представляют собой водород или алкил;

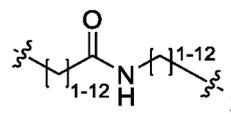
$m_1$ ,  $p_1$  и  $q_1$  независимо представляют собой 0 или 1;



$V_1$  представляет собой ;

$R_{b5}$ ,  $R_{b6}$  и  $R_{b7}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$  или  $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ;

$z_8$  и  $z_9$  независимо представляют собой целые числа от 0 до 10;



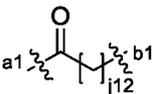
$L_2$  представляет собой  $-(CH_2)_{j15}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j16}-$  или

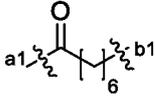
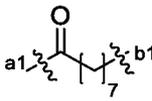
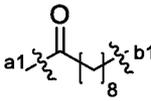
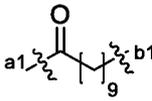
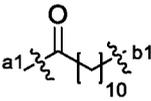
$j_{15}$  и  $j_{16}$  независимо представляют собой целые числа от 0 до 4;

$r_1$  представляет собой 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления  $L_1$  может представлять собой  $L_3$  или  $L_3-R_{110}-R_{111}-L_3$ , где  $L_3$  независимо представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкильную цепь,  $-(CH_2)_{j11}-C(=O)-(CH_2)_{j12}-$  или  $-(CH_2)_{j13}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j14}-$ ;  $R_{110}$  и  $R_{111}$  независимо представляют собой химические связи,  $-NR_{112}-$ ,  $-C(=O)-$  или  $-OC(=O)-$ ;  $R_{112}$  представляет собой водород или  $C_1-C_{12}$  алкил;  $j_{11}$ ,  $j_{12}$ ,  $j_{13}$  и  $j_{14}$  независимо представляют собой целые числа 0-10. В некоторых вариантах осуществления  $j_{11}$ ,  $j_{12}$ ,  $j_{13}$  и  $j_{14}$  независимо представляют собой целые числа 0-2 или 4-10. В некоторых вариантах осуществления  $j_{11}$ ,  $j_{12}$ ,  $j_{13}$  и  $j_{14}$  независимо представляют собой 0, 1, 2, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах осуществления  $L_1$  может представлять собой  $-(CH_2)_{j11}-C(=O)-(CH_2)_{j12}-$ , где  $j_{11}$  и  $j_{12}$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления  $L_1$  может представлять собой  и  $j_{12}$  является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, где конец  $a_1$  присоединен к  $V_1$ , и конец  $b_1$  присоединен к  $R_{11}$ .

В некоторых вариантах осуществления  $L_1$  может представлять собой , , ,  или , где конец  $a_1$  присоединен к  $V_1$  и конец  $b_1$  присоединен к  $R_{11}$ .

В некоторых вариантах осуществления  $R_{11}$  может представлять собой химическую связь и  $R_{12}$  может представлять собой  $C=O$ .

В некоторых вариантах осуществления  $R_{11}$  может представлять собой химическую связь и  $R_{12}$  может представлять собой  $NR_{16}$ , где  $R_{16}$  является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{11}$  может представлять собой химическую связь и  $R_{12}$  может представлять собой  $-OC(=O)-$ .

В некоторых вариантах осуществления  $R_{11}$  может представлять собой  $NR_{16}$  и  $R_{12}$  может представлять собой  $C=O$ , где  $R_{16}$  является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $R_1$  может представлять собой  $NR_{16}$  и  $R_{12}$  может представлять собой  $-OC(=O)-$ , где  $R_{16}$  является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{12}$  может представлять собой  $NR_{16}$  и  $R_{11}$  может представлять собой  $C=O$ , где  $R_{16}$  является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{12}$  может представлять собой  $NR_{16}$  и  $R_{11}$  может представлять собой  $-OC(=O)-$ , где  $R_{16}$  является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{11}$  может представлять собой  $NH$  и  $R_{12}$  может представлять собой  $C=O$ .

В некоторых вариантах осуществления  $R_{12}$  может представлять собой  $NH$ , и  $R_{11}$  может представлять собой  $C=O$ .

В некоторых вариантах осуществления  $R_{16}$  может представлять собой водород или  $C_{1-6}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{16}$  может представлять собой водород, метил, этил, пропил или изопропил.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{16}$  может представлять собой водород.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{17}$  и  $R_{18}$  могут представлять собой водород.

В некоторых вариантах осуществления  $R_{19}$  может представлять собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, когда присутствует кольцо А, кольцо А может представлять собой  $C_{6-12}$  арил.

В некоторых вариантах осуществления кольцо А может представлять собой фенил.

В некоторых вариантах осуществления  $m_1$  может представлять собой 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления  $m_1$  может представлять собой 3.

В некоторых вариантах осуществления  $n_1$  может представлять собой 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления  $p_1$  и  $q_1$  независимо представляют собой 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления  $p_1$  равен 1 и  $q_1$  равен 1.

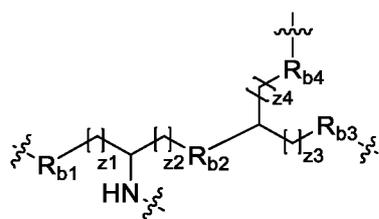
В некоторых вариантах осуществления  $p_1$  равен 1 и  $q_1$  равен 0.

В некоторых вариантах осуществления  $p_1$  равен 0 и  $q_1$  равен 1.

В некоторых вариантах осуществления  $p_1$  равен 0 и  $q_1$  равен 0.

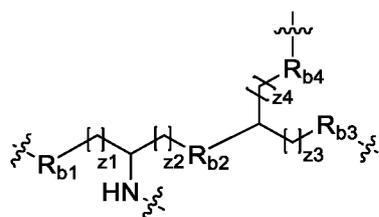
В некоторых вариантах осуществления  $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$  и  $z_9$  независимо могут представлять собой целые числа 0-4. В некоторых вариантах осуществления  $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$  и  $z_9$  независимо могут представлять собой целые числа 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой

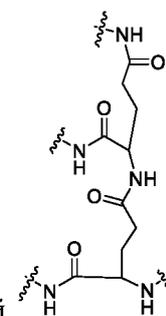


, где  $R_{b1}, R_{b2}, R_{b3}$  и  $R_{b4}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-$  или  $-NHC(=O)-$ ; атом N присоединен к  $L_1$ ;  $z_1, z_2, z_3$  и  $z_4$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

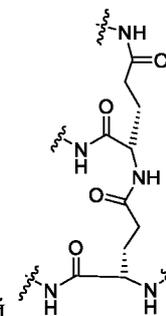
В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой



, где  $R_{b1}, R_{b2}, R_{b3}$  и  $R_{b4}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-$  или  $-NHC(=O)-$ ; атом N присоединен к  $L_1$ ;  $R_{b1}, R_{b3}$  и  $R_{b4}$  идентичны;  $z_1, z_2, z_3$  и  $z_4$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

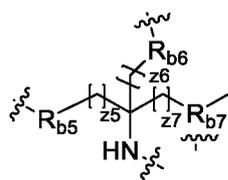


В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой



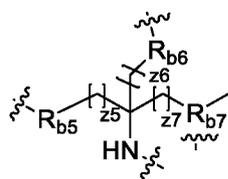
В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой

В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой



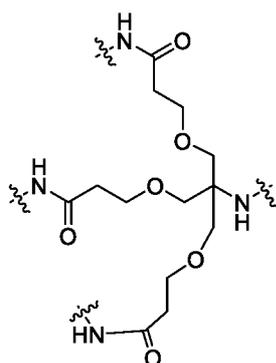
, где  $R_{b5}$ ,  $R_{b6}$  и  $R_{b7}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$  или  $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ; атом N присоединен к  $L_1$ ;  $z_5$ ,  $z_6$ ,  $z_7$ ,  $z_8$  и  $z_9$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой



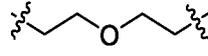
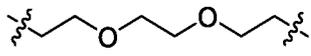
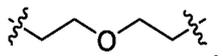
, где  $R_{b5}$ ,  $R_{b6}$  и  $R_{b7}$  независимо представляют собой  $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$  или  $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ; атом N присоединен к  $L_1$ ;  $R_{b5}$ ,  $R_{b6}$  и  $R_{b7}$  являются идентичными;  $z_5$ ,  $z_6$ ,  $z_7$ ,  $z_8$  и  $z_9$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $V_1$  может представлять собой

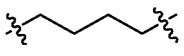
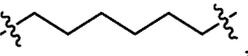
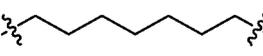
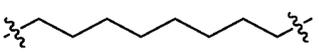


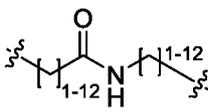
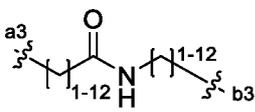
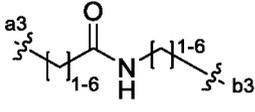
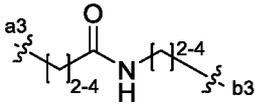
В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой  $L_4$  или  $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$ , где  $L_4$  независимо представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкильную цепь или  $-(CH_2)_{j15}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j16}-$ ;  $R_{13}$  и  $R_{14}$  независимо представляют собой химические связи,  $-NR_{115}-$ ,  $-C(=O)-$  или  $-OC(=O)-$ ;  $R_{115}$  независимо представляет собой водород или  $C_1-C_{12}$  алкил;  $j15$  и  $j16$  независимо представляют собой целые числа 0-10. В некоторых вариантах осуществления  $j15$  и  $j16$  независимо представляют собой целые числа от 0 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $j15$  и  $j16$  независимо представляют собой 0, 1, 2, 3 или 4.

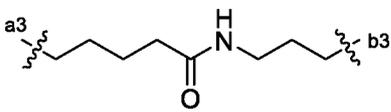
В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой  $-(CH_2)_{j15}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j16}-$ , где  $j15$  и  $j16$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой  или . В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой , где одна сторона присоединена к атому O, а другая сторона присоединена к  $B_1$ .

В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой  $C_1-C_{12}$  алкильную цепь.

В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой , ,  или .

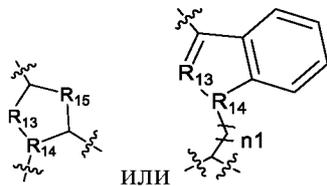
В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой . В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой или  или . В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой , где конец  $a_3$  присоединен к атому O, а конец  $b_3$  присоединен к  $B_1$ .

В некоторых вариантах осуществления  $L_2$  может представлять собой , где конец  $a_3$  присоединен к атому O, а конец  $b_3$  присоединен

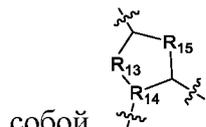
к В<sub>1</sub>.

В некоторых вариантах осуществления г1 может представлять собой 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления г1 может представлять собой 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Q<sub>3</sub> может представлять собой

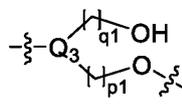


или

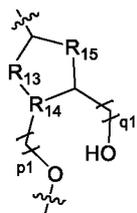


с собой, где R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub> и p1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

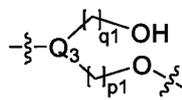


может представлять собой

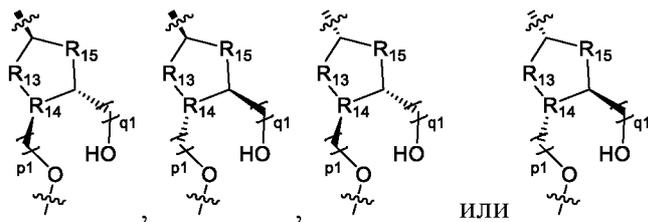


, где R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, p1 и q1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

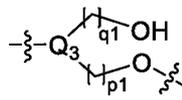


может представлять собой,

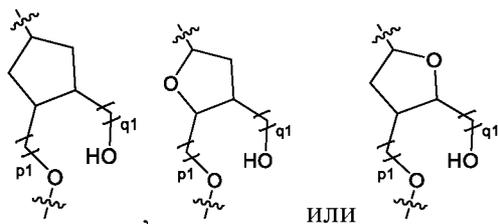


или, где R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, p1 и q1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

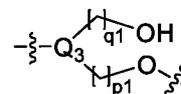


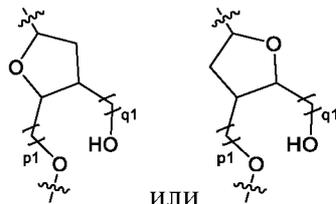
может представлять собой



или

. В некоторых вариантах осуществления

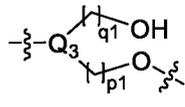




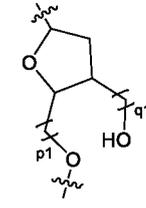
может представлять собой

или

. В некоторых вариантах осуществления



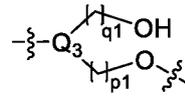
может представлять собой



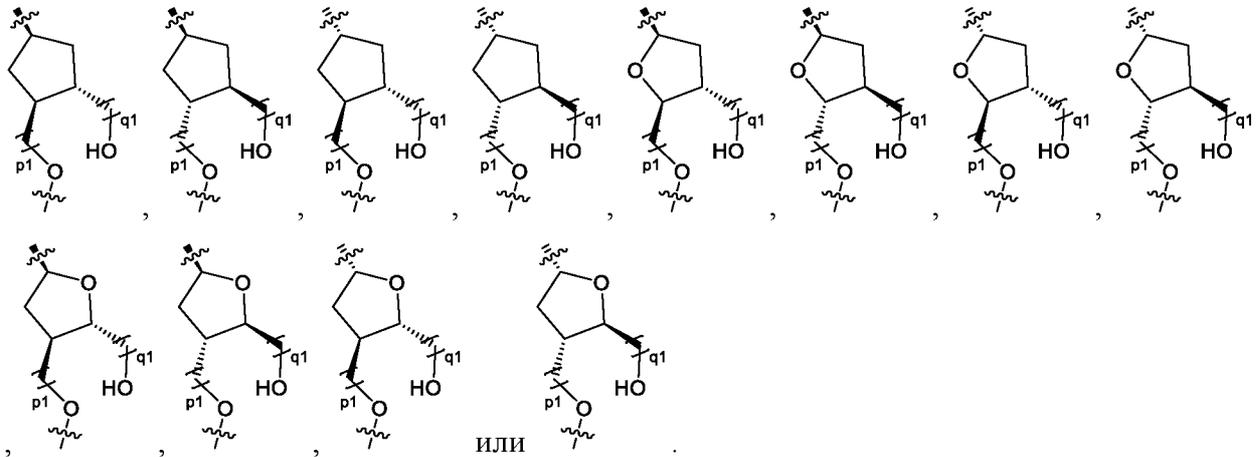
. p1 и q1 являются такими, как

определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

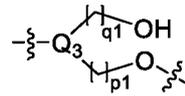


может представлять собой

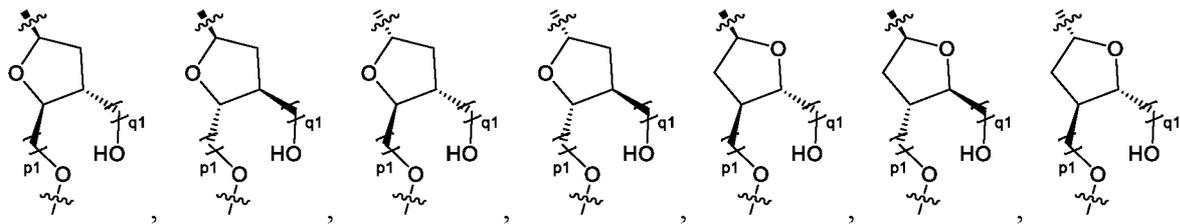


ИЛИ

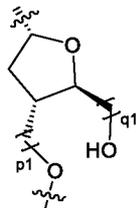
В некоторых вариантах осуществления



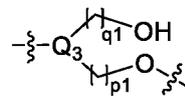
может представлять собой



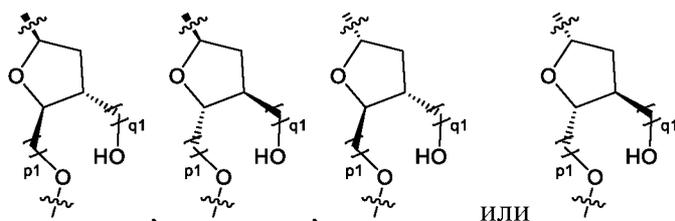
ИЛИ



В некоторых вариантах осуществления

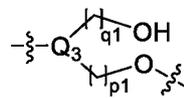


может представлять собой

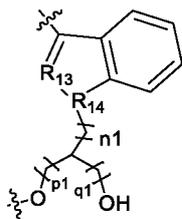


или . p1 и q1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

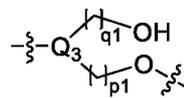


может представлять собой

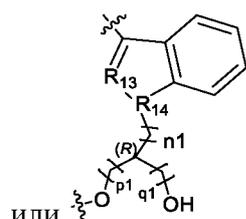
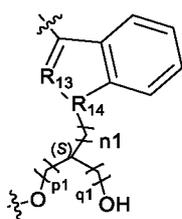


, где R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, p1 и q1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

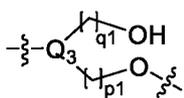


может представлять собой

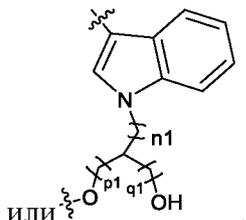
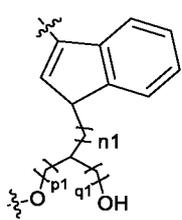


или , где R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, n1, p1 и q1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

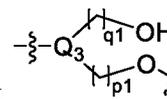
В некоторых вариантах осуществления



может представлять собой,



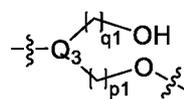
или . В некоторых вариантах осуществления



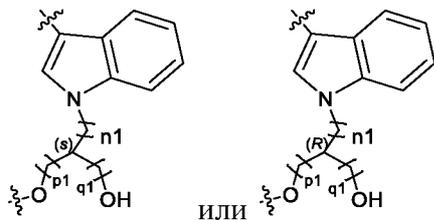
может

представлять собой . n1, p1 и q1 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления

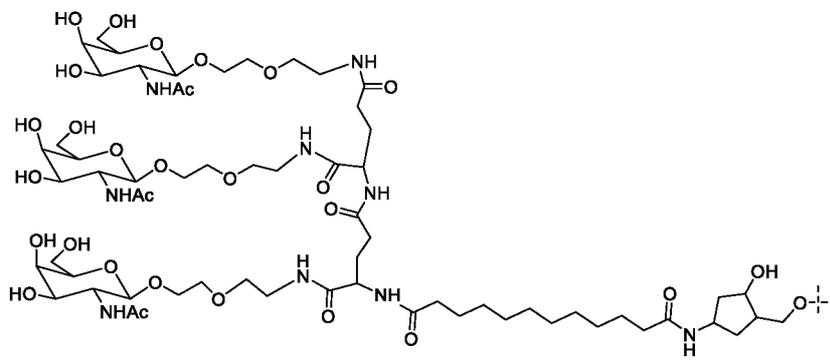
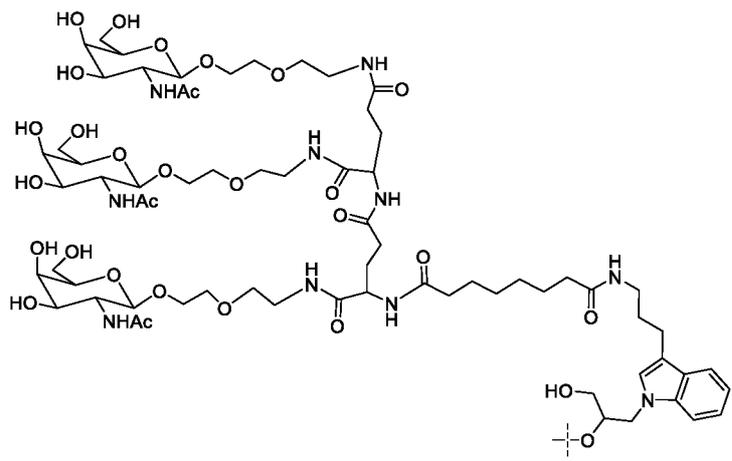
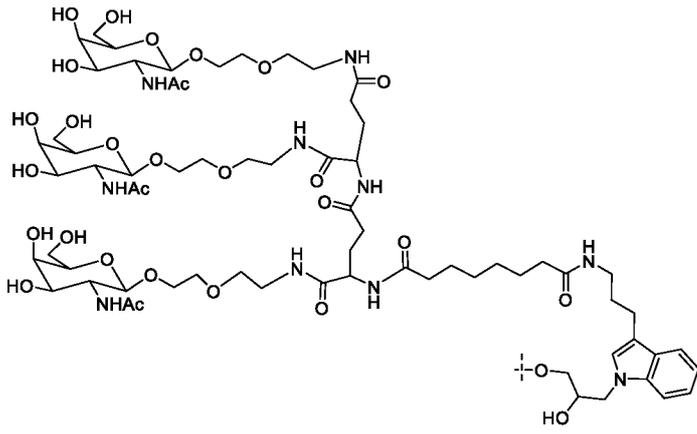


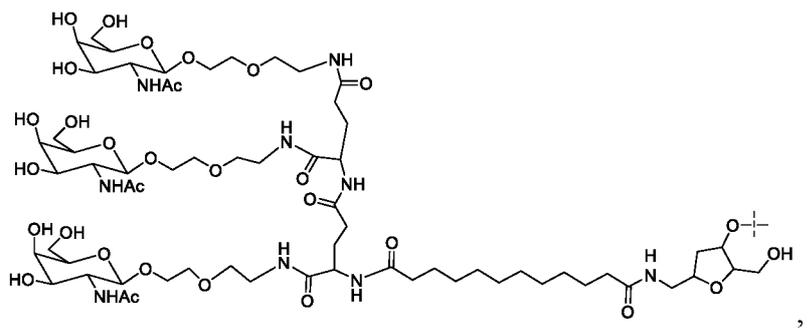
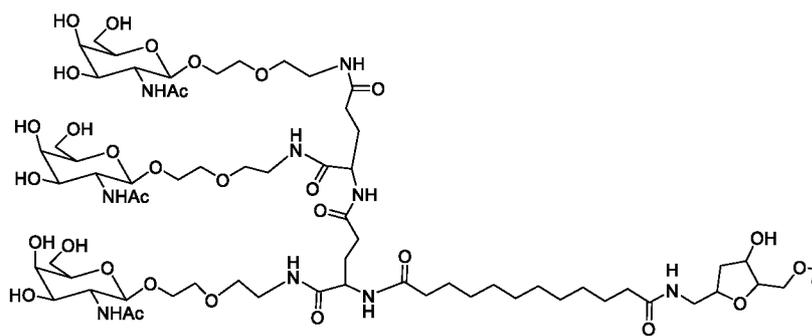
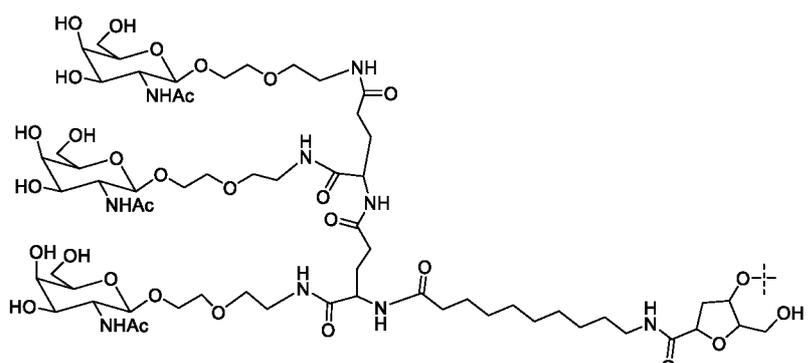
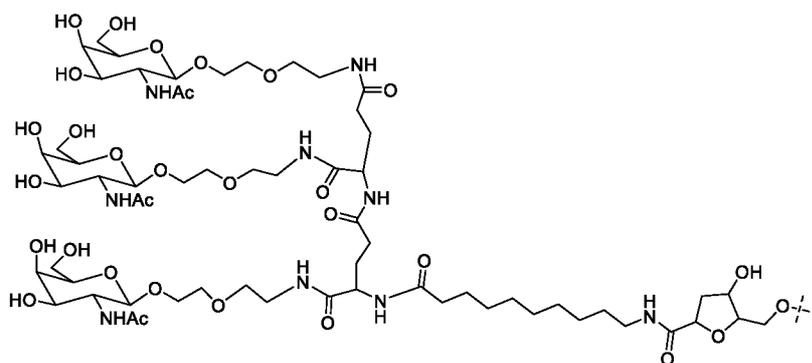
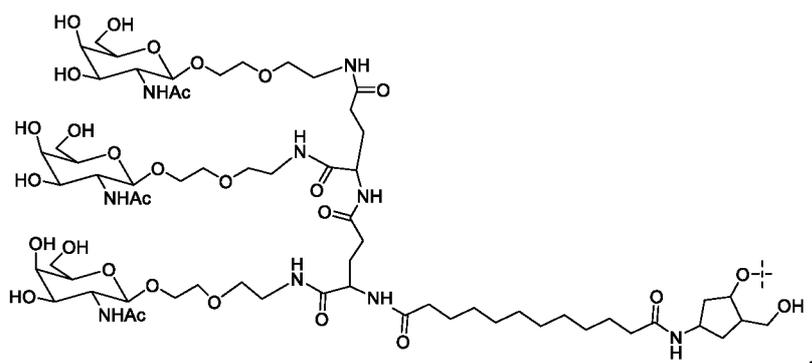
может представлять собой

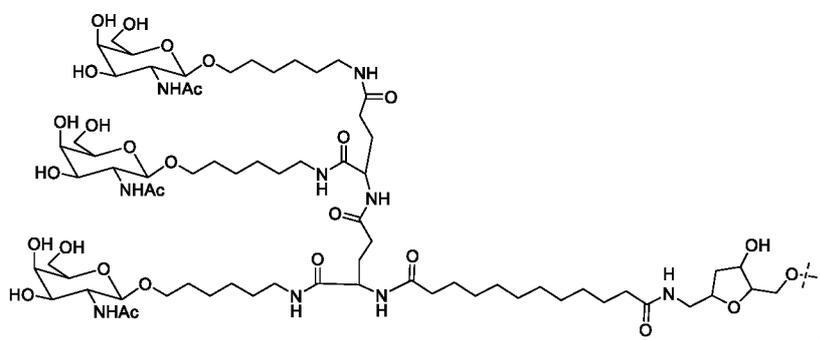
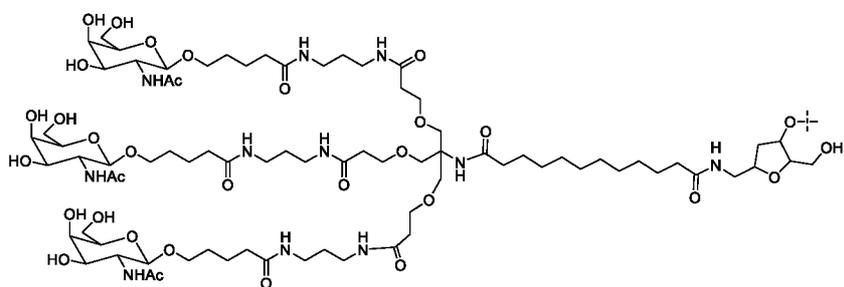
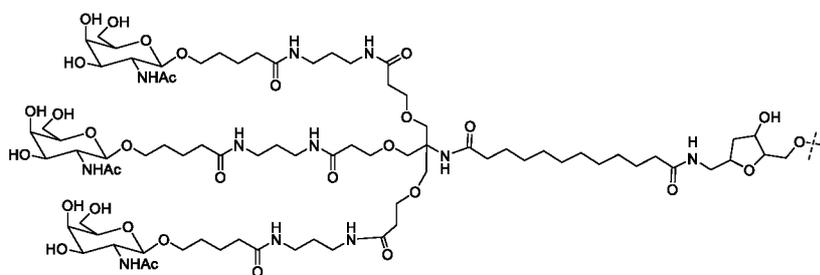
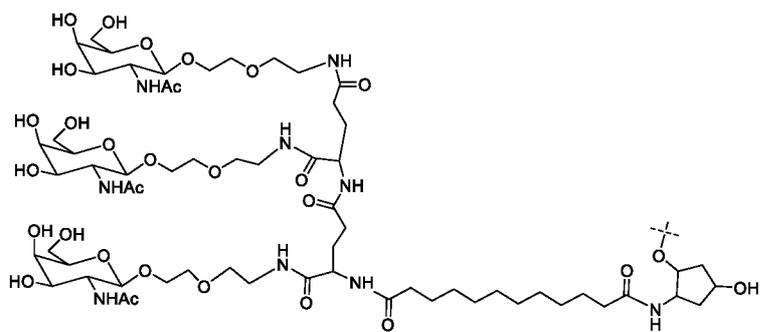
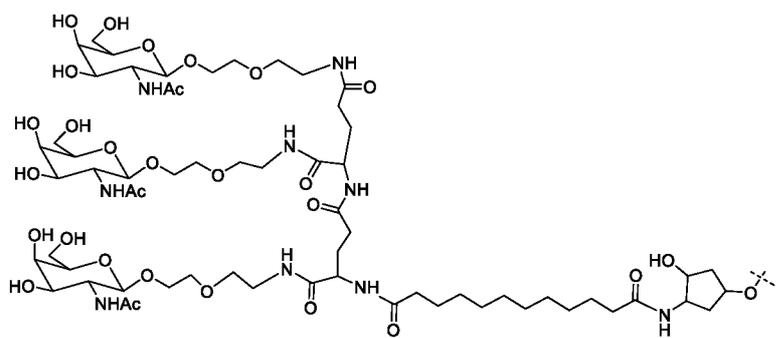


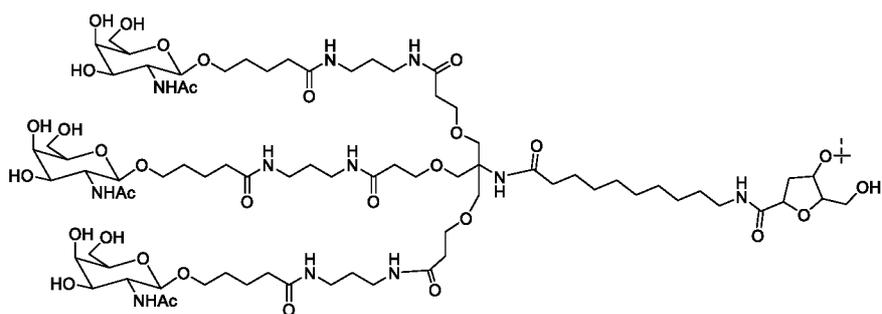
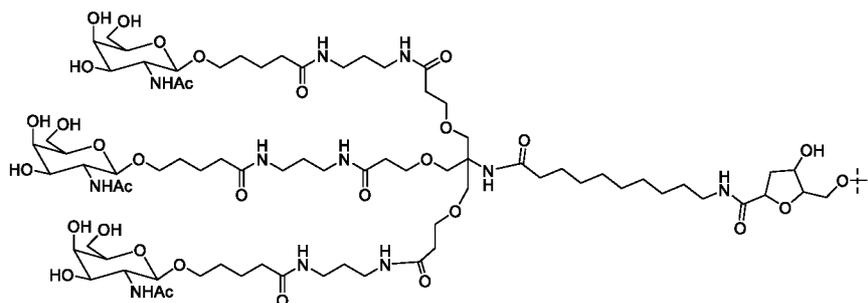
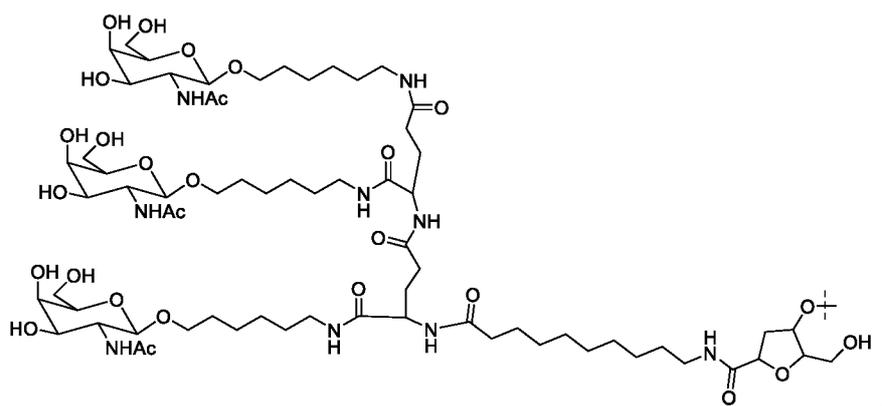
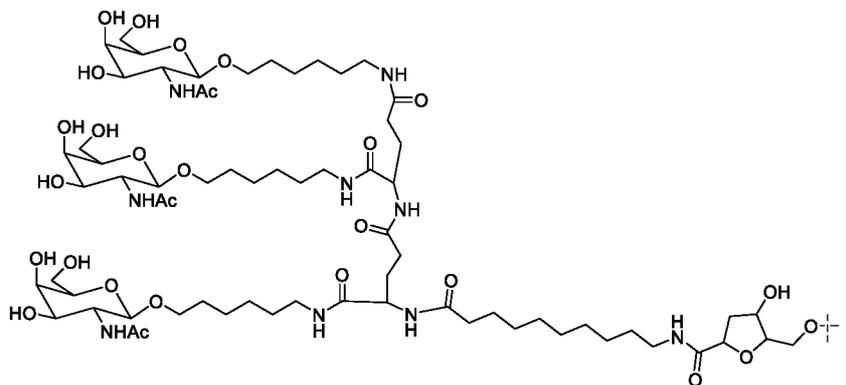
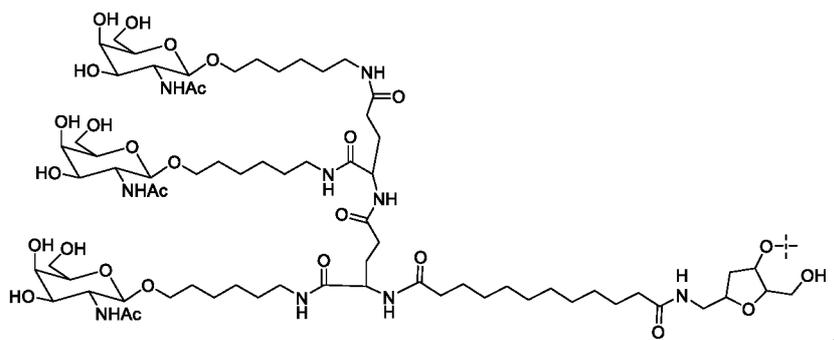
или , где  $n1$ ,  $p1$  и  $q1$  являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд может представлять собой любую из следующих структур или их фармацевтически приемлемых солей:





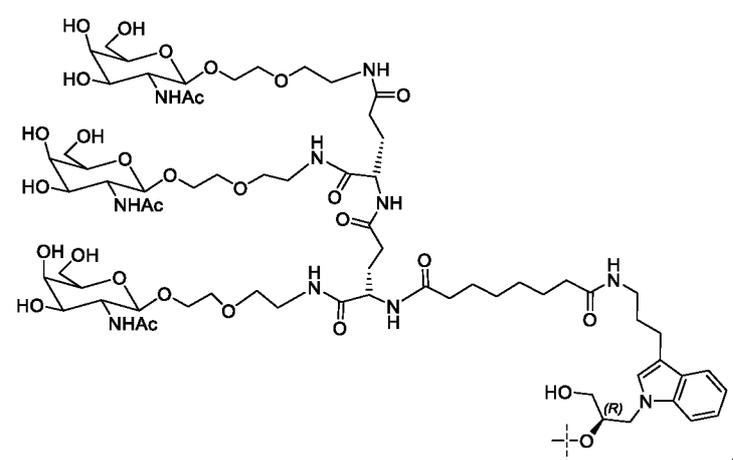
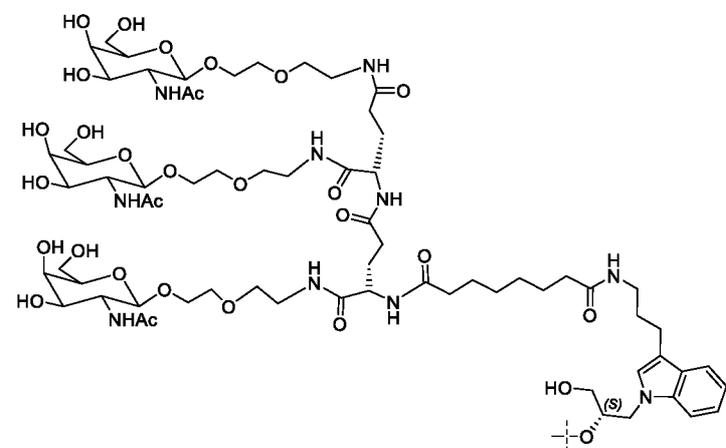
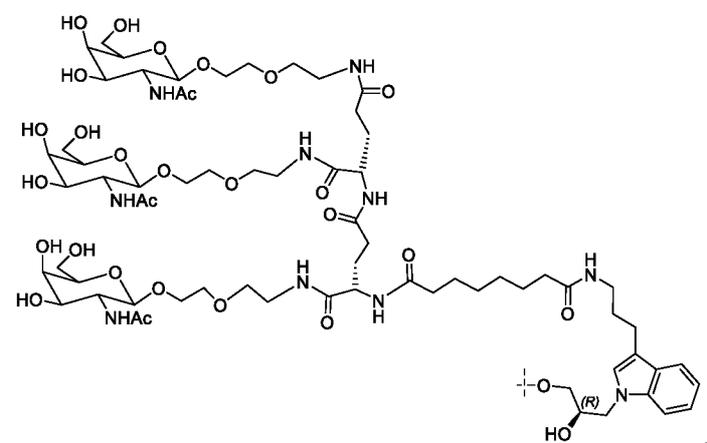
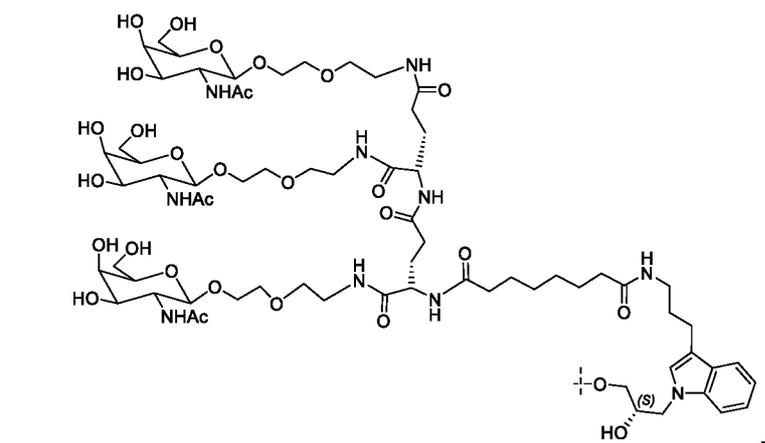


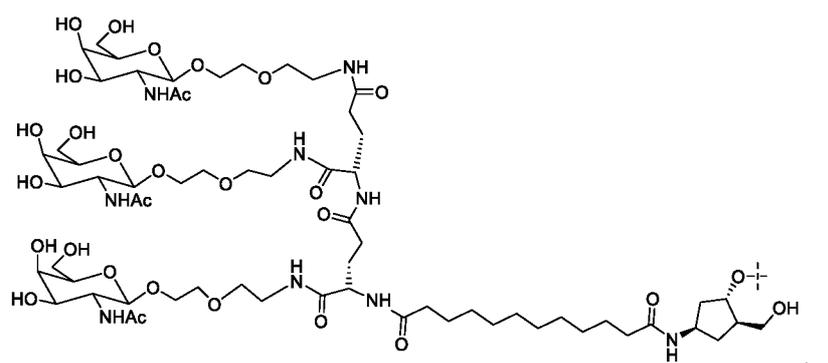
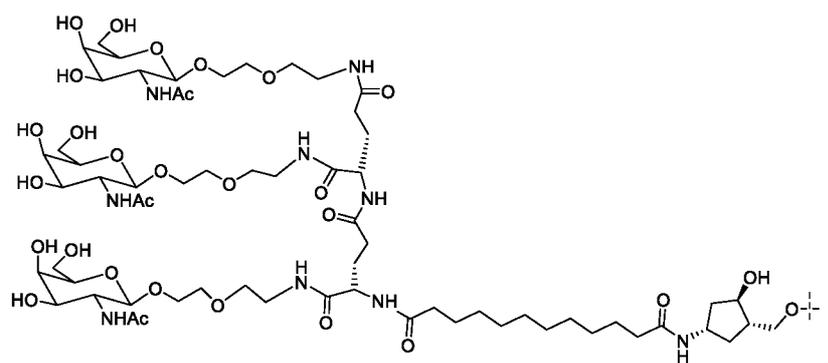
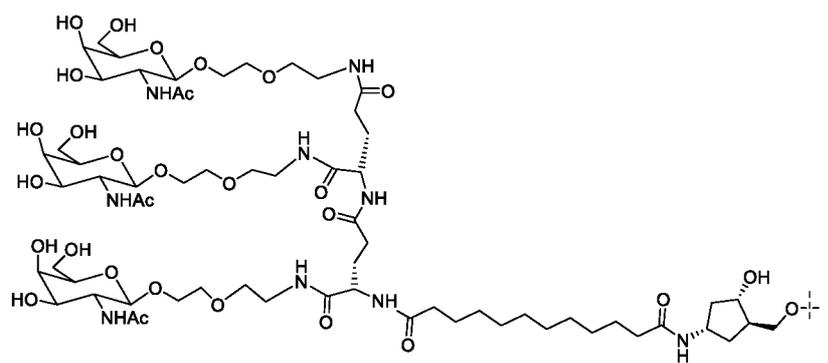
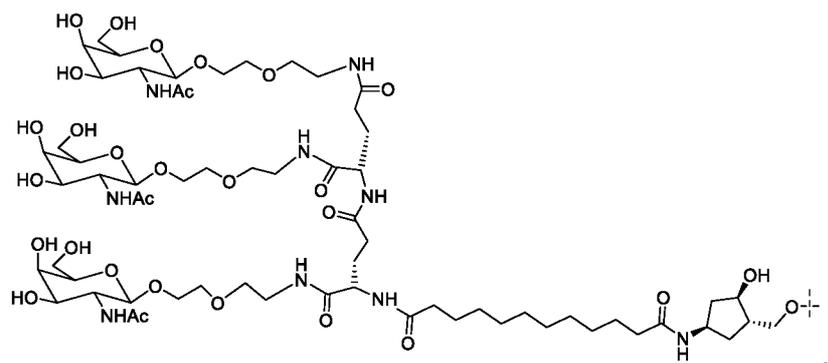
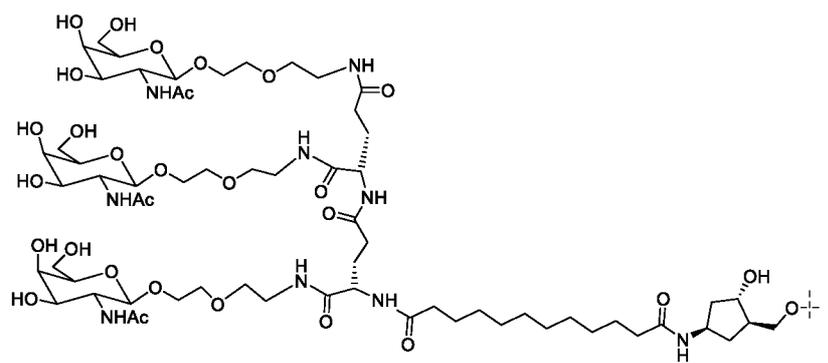


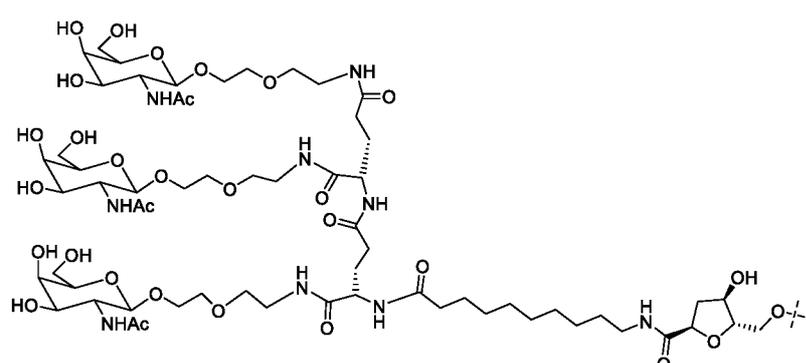
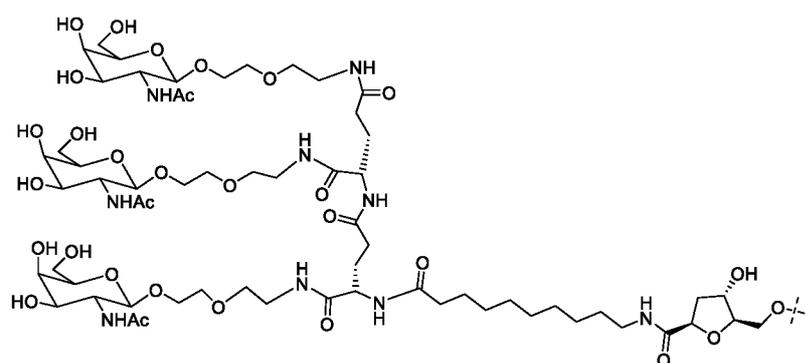
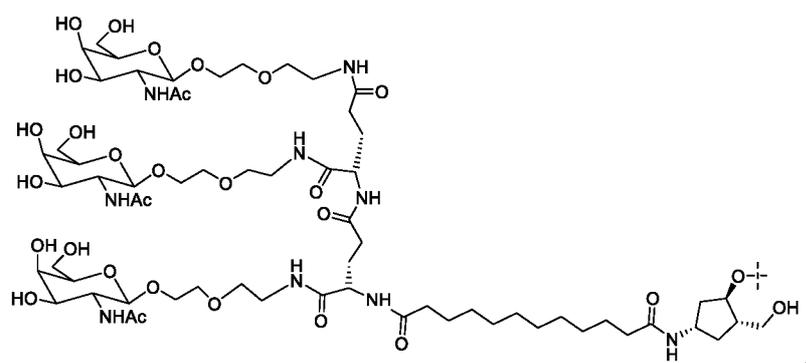
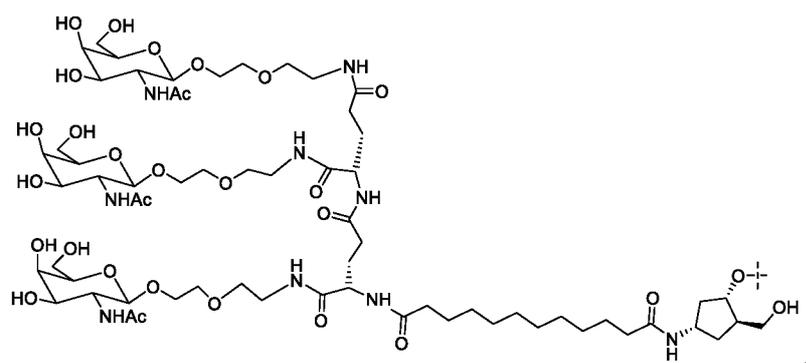
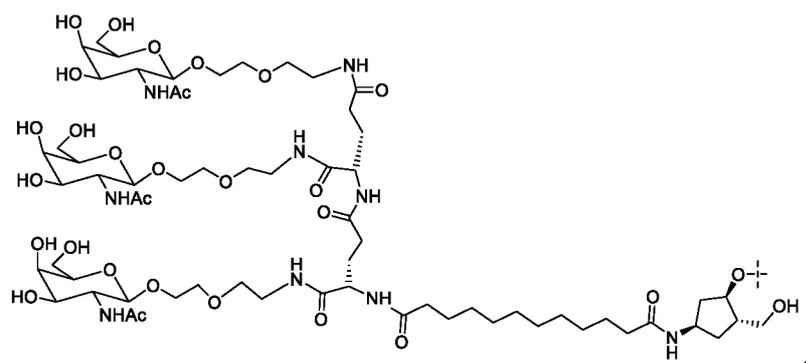
ИЛИ

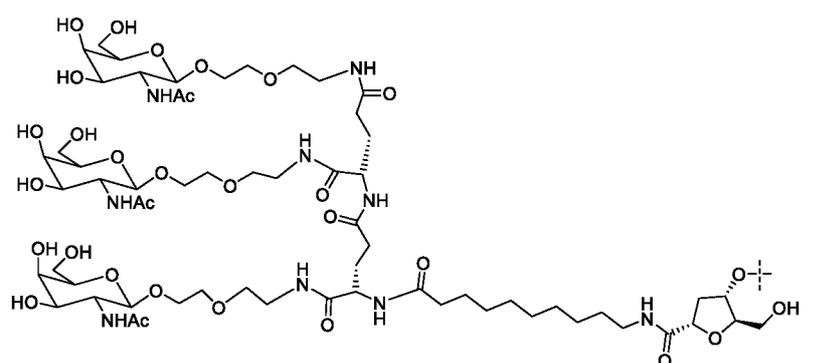
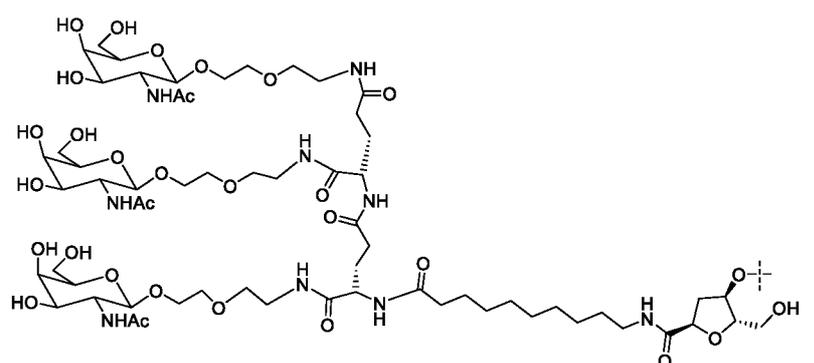
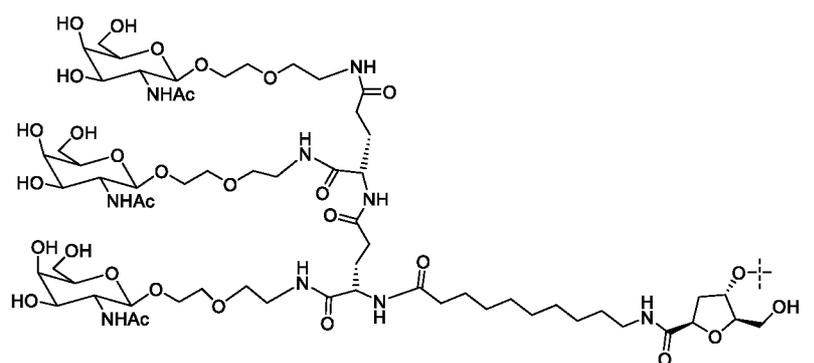
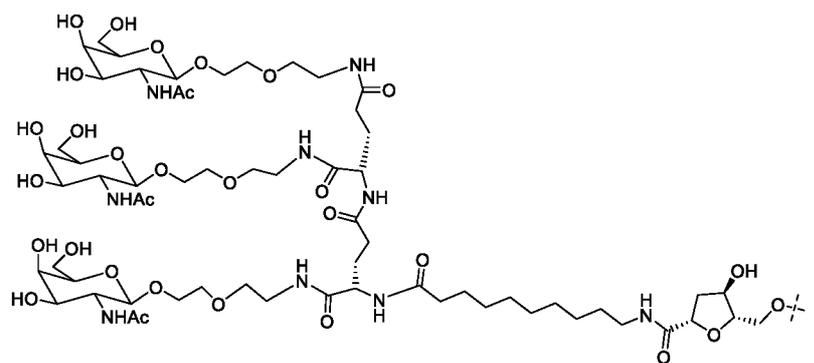
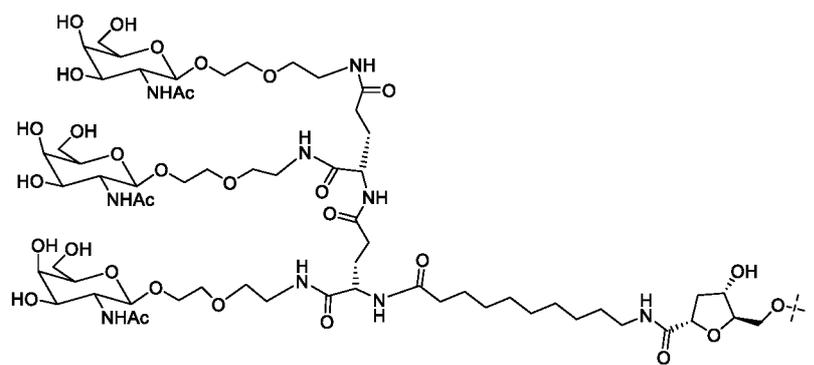
В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд может представлять

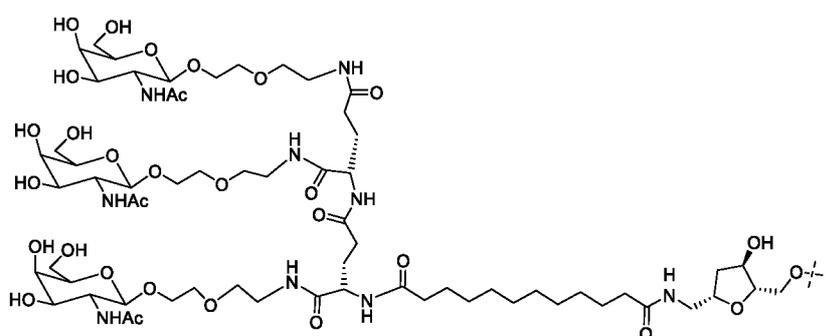
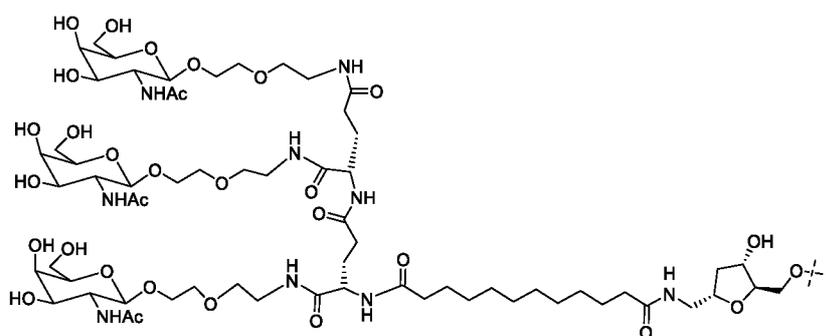
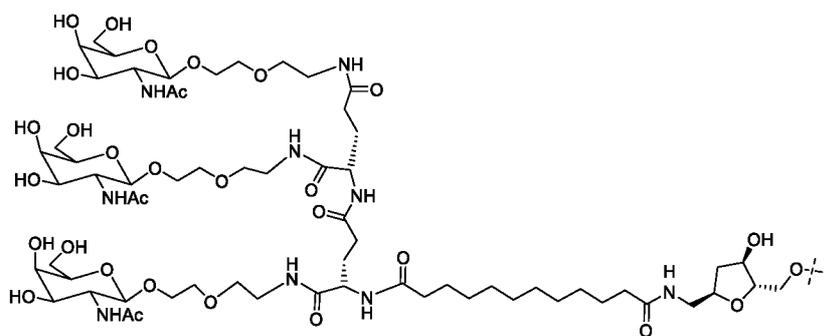
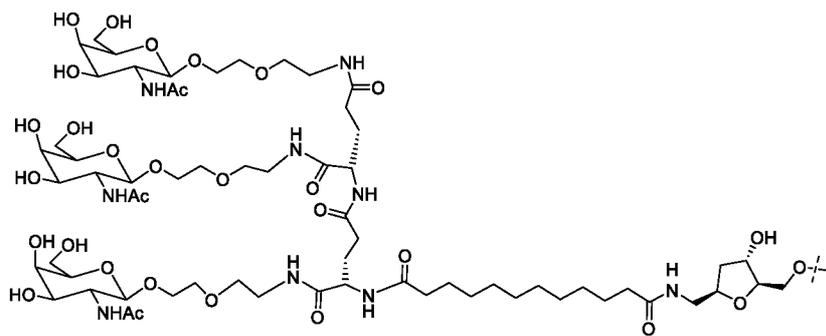
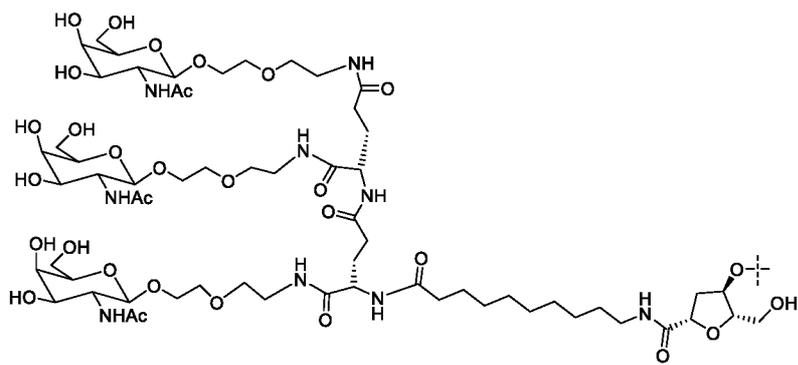
собой любую из следующих структур или их фармацевтически приемлемых солей:

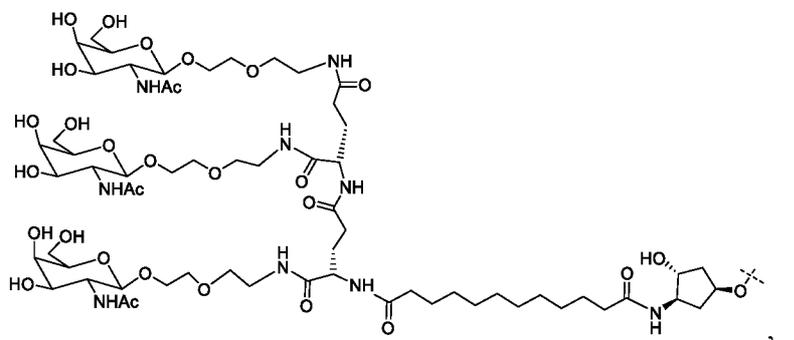
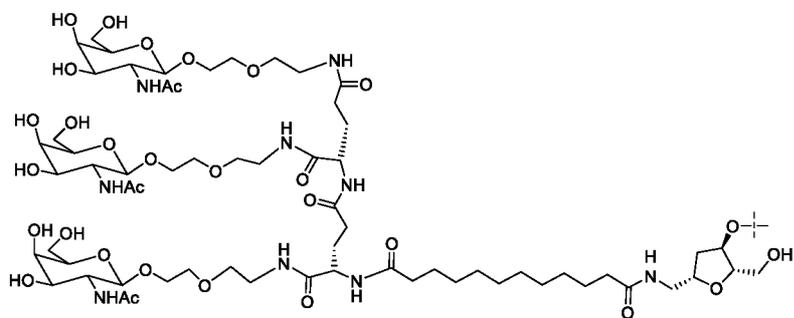
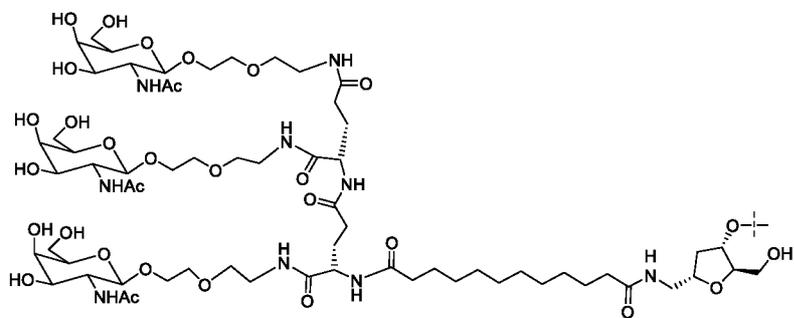
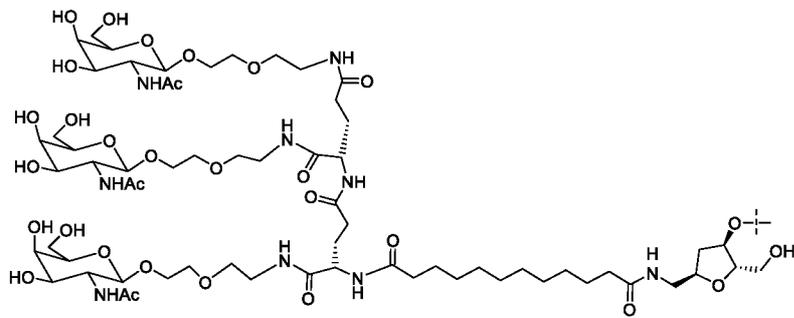
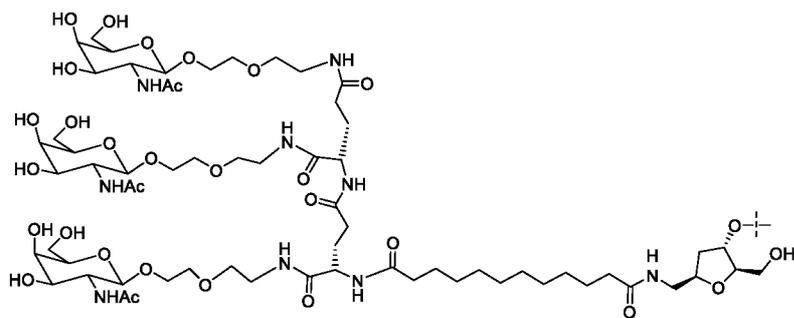


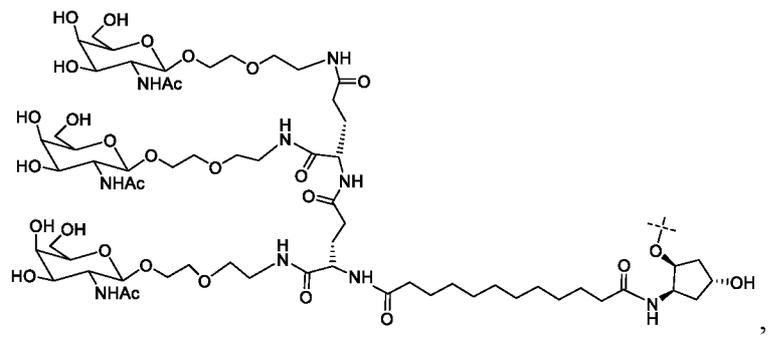
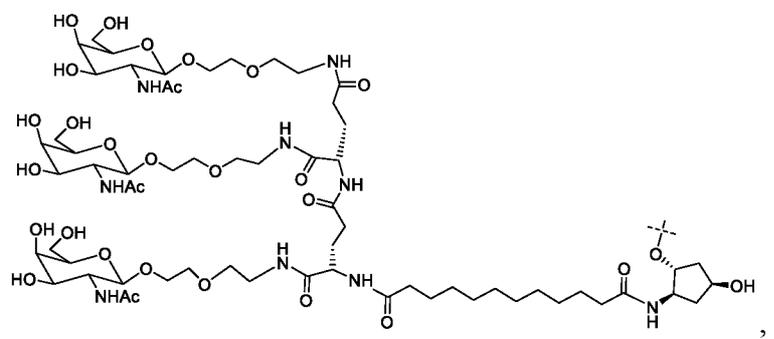
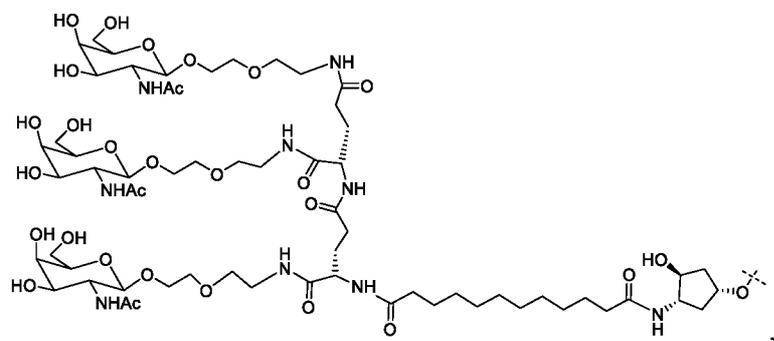
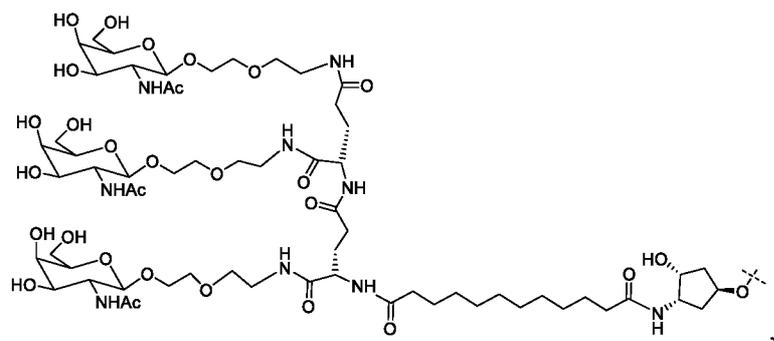
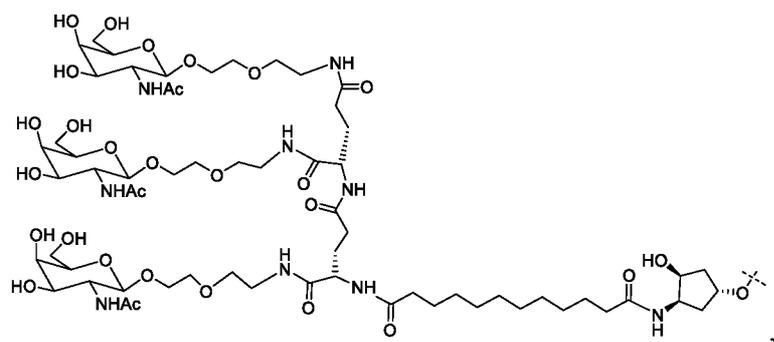


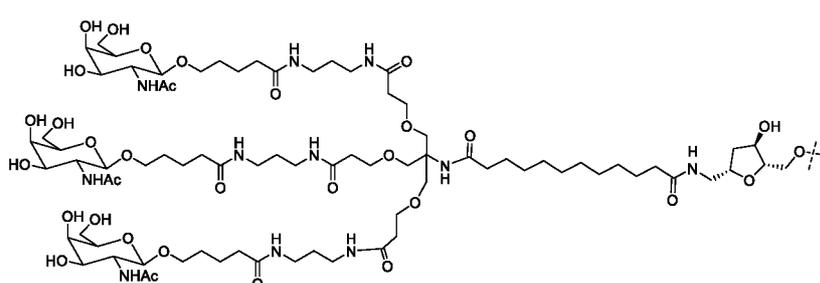
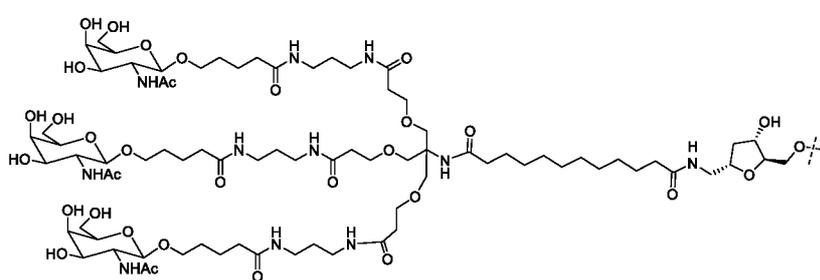
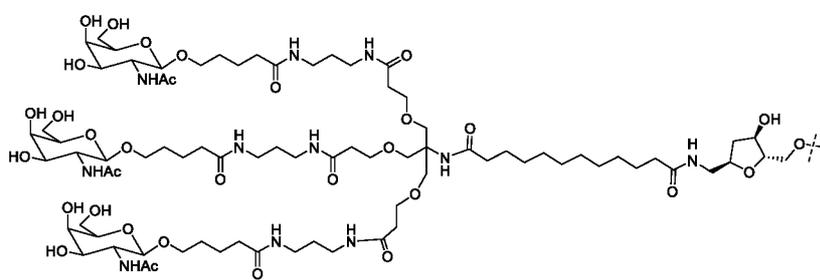
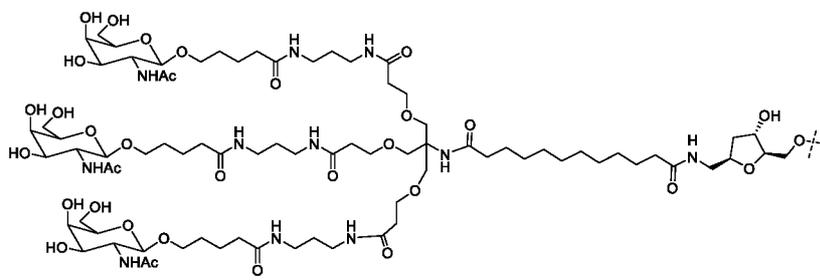
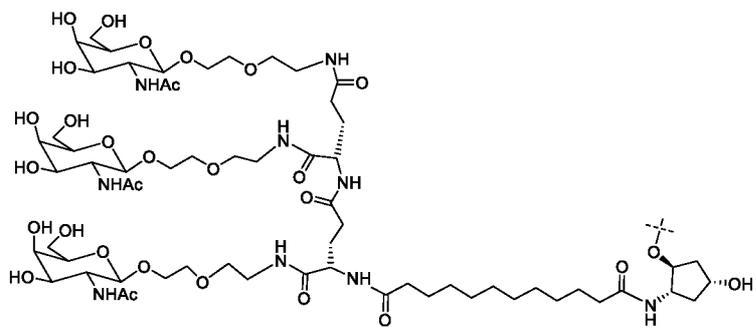
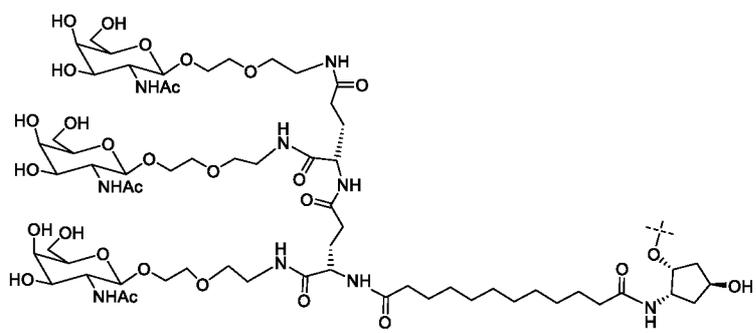


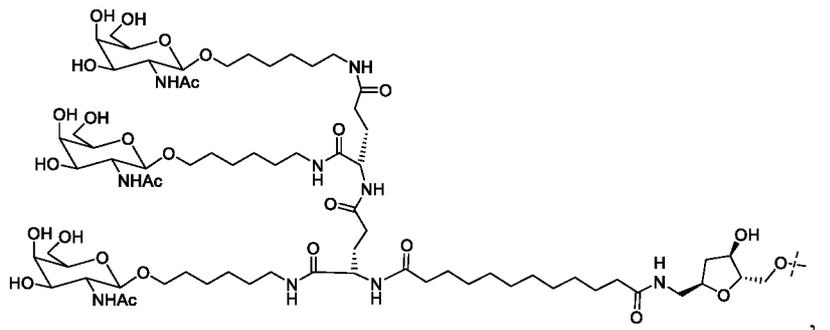
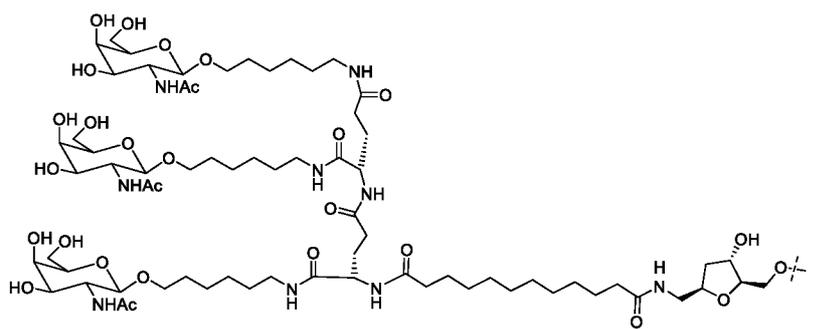
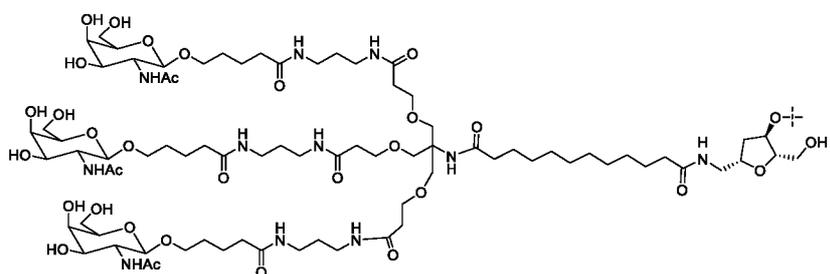
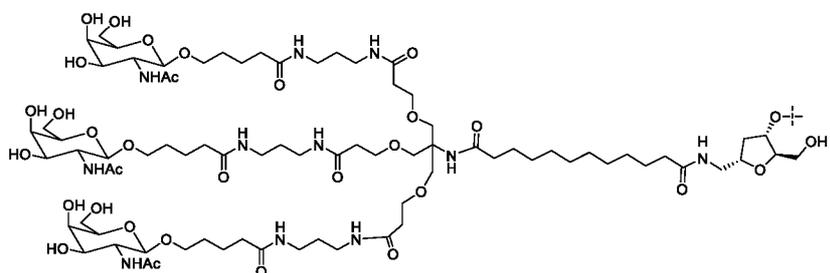
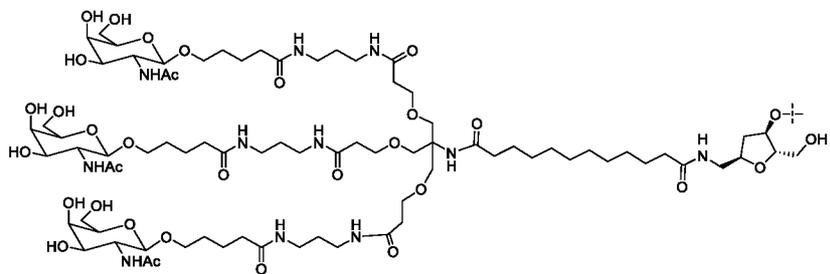
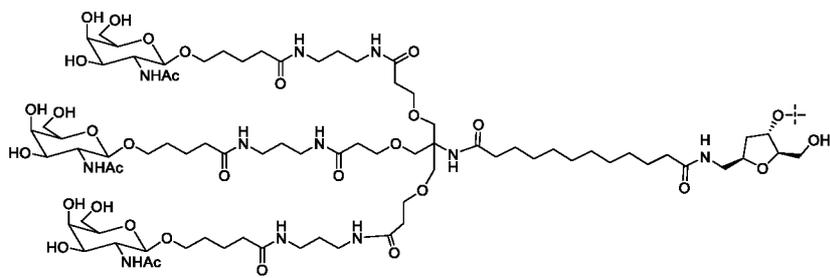


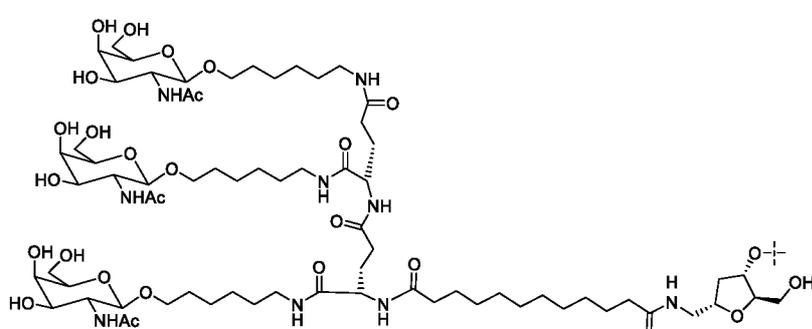
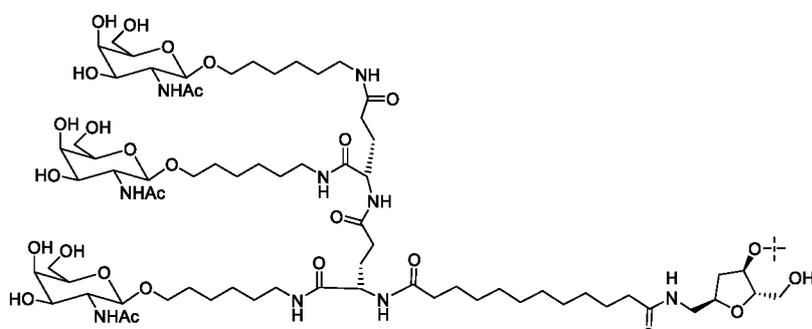
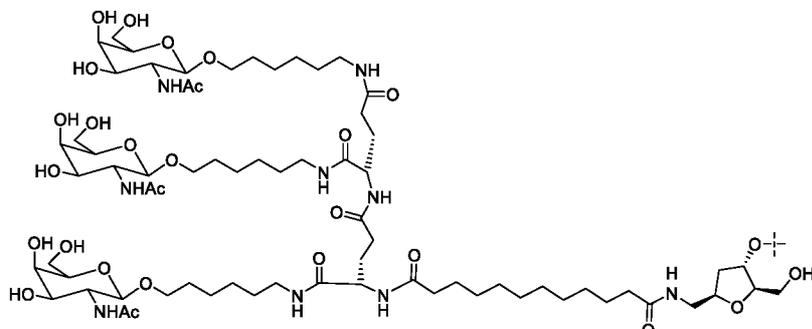
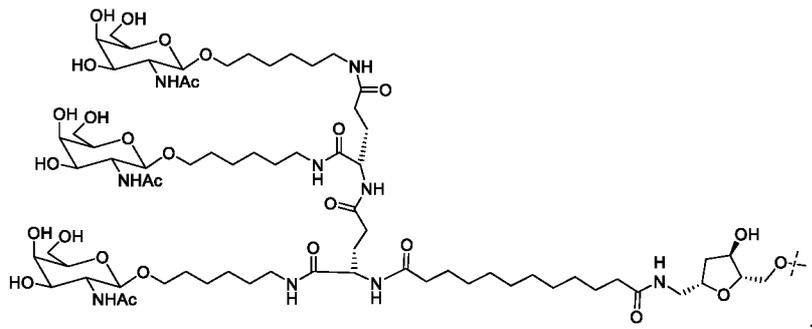
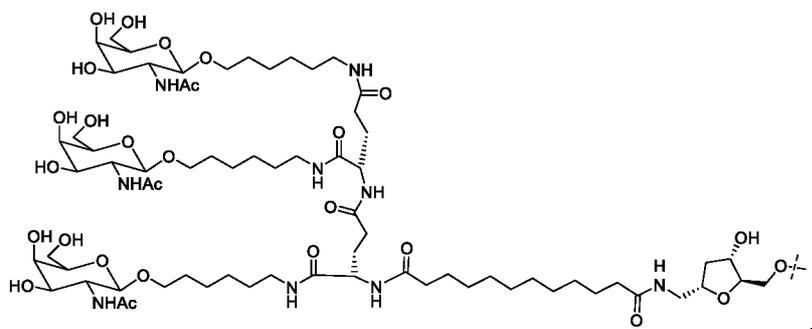


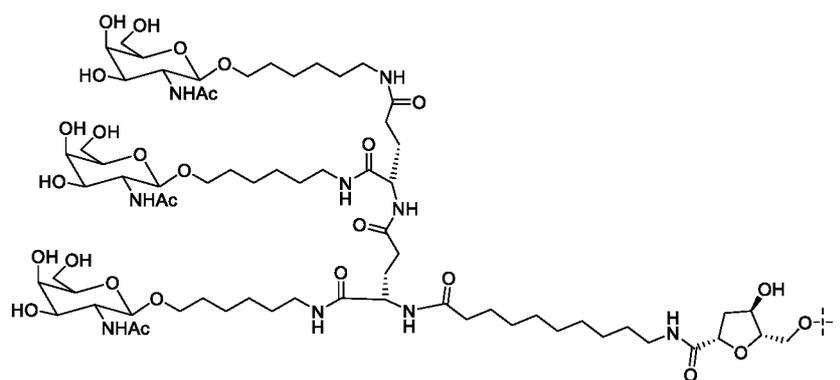
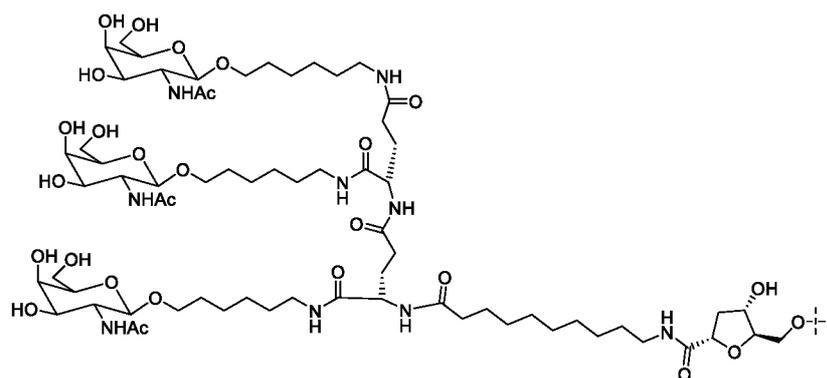
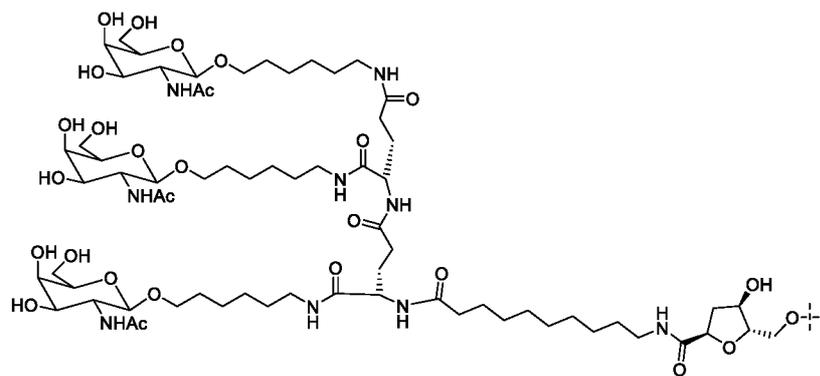
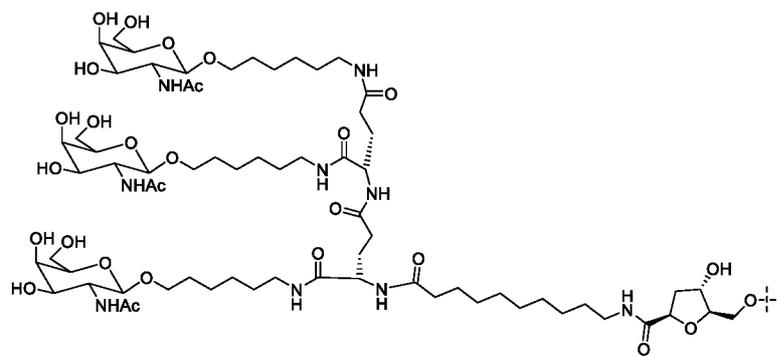
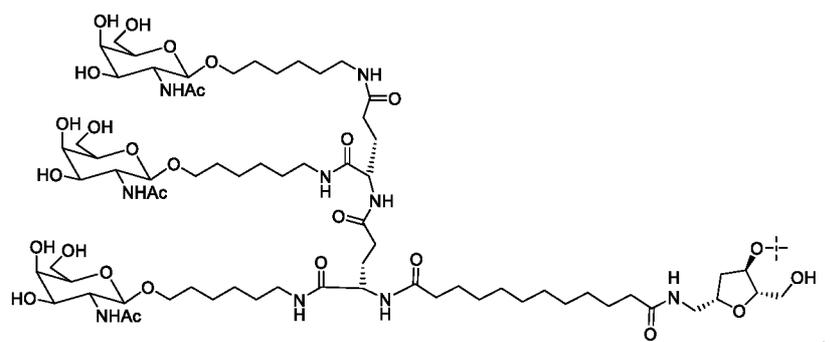


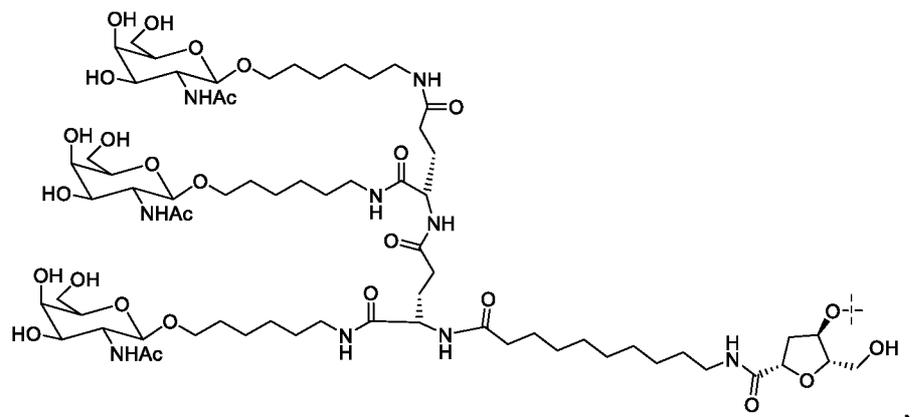
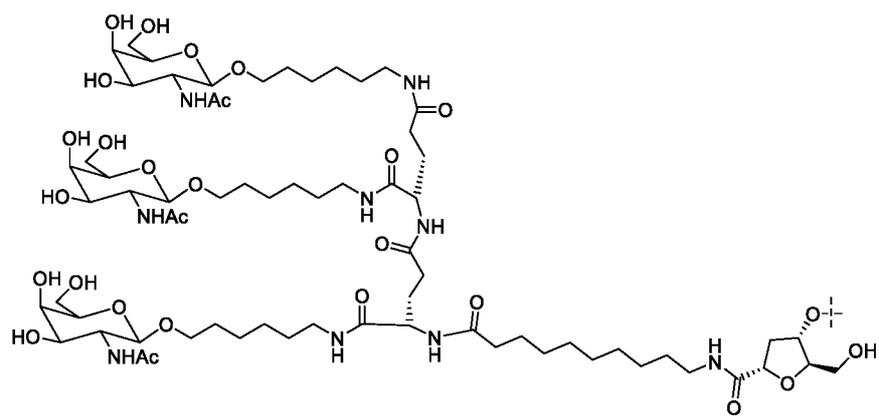
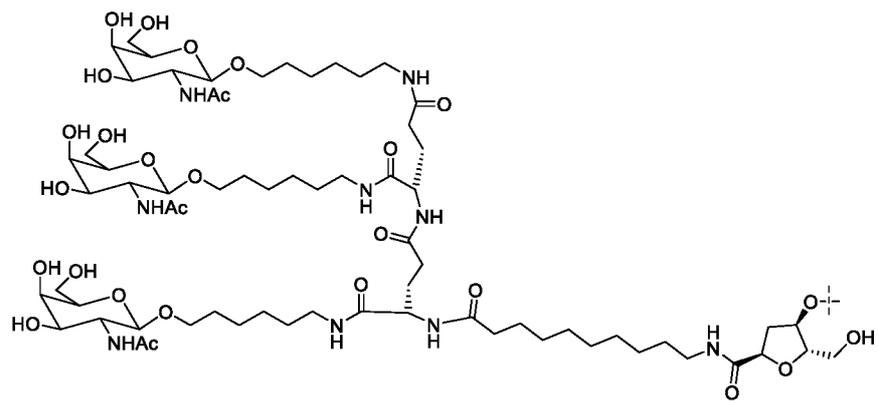
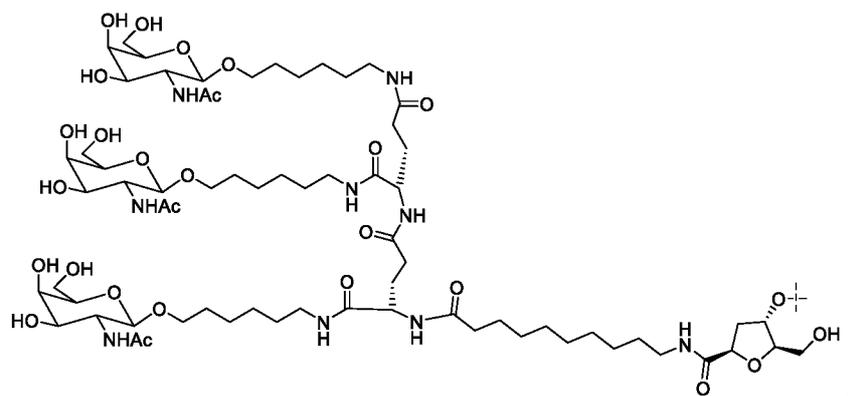


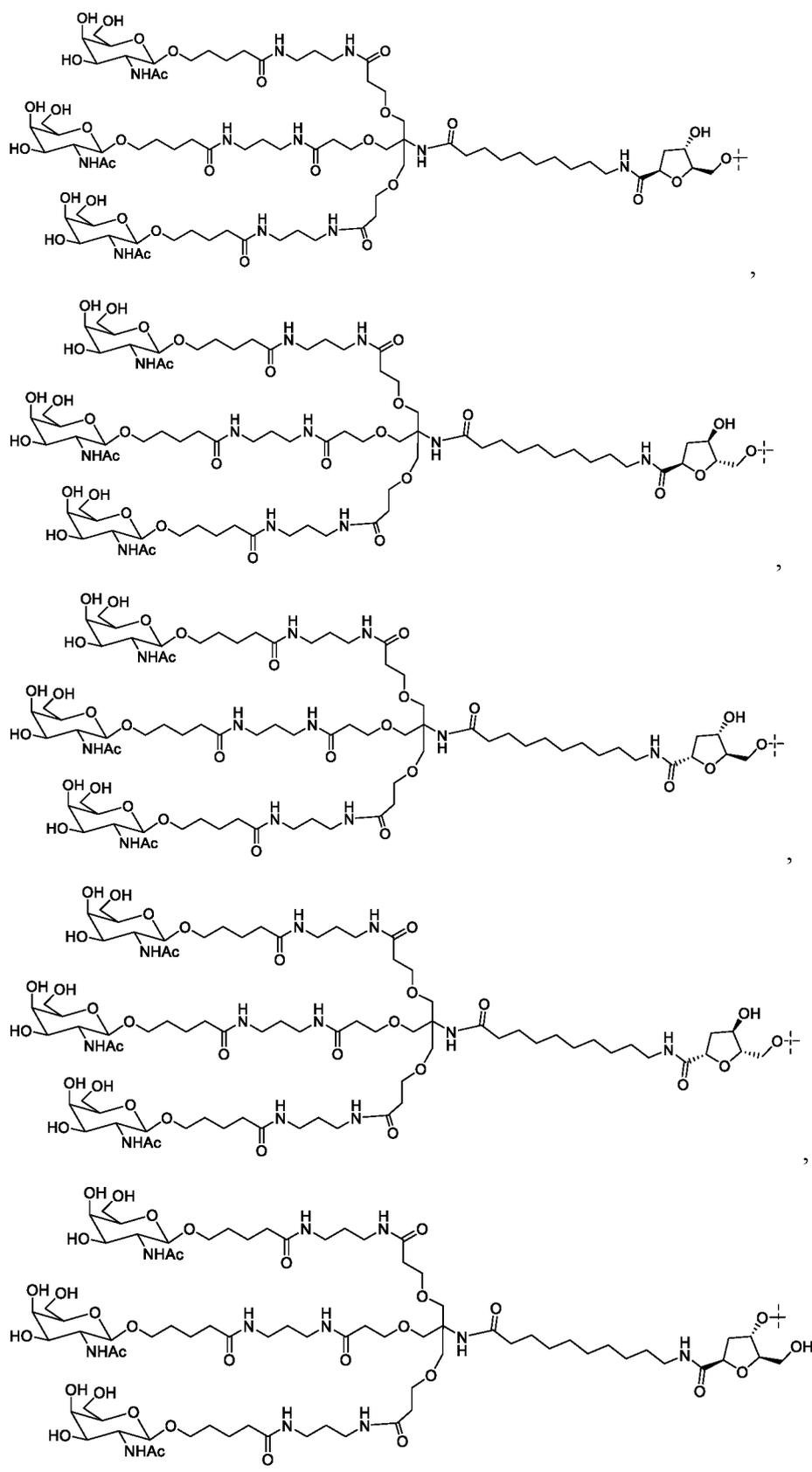


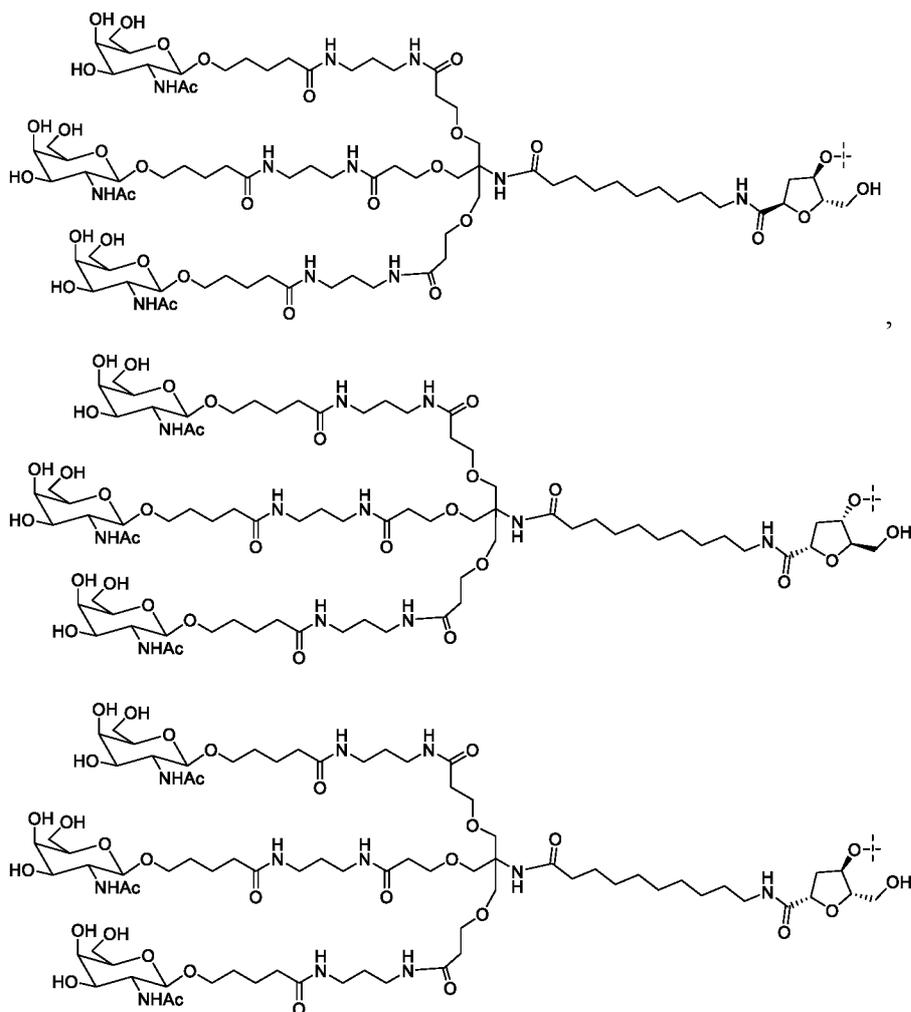




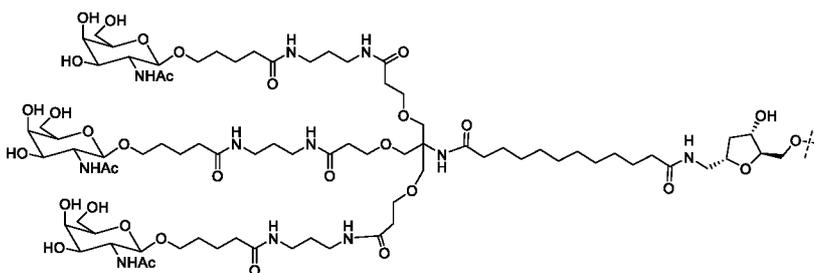








В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из следующей структуры или ее фармацевтически приемлемой соли,



В некоторых вариантах осуществления фрагмент N-ацетилгалактозамина в указанном выше нацеливающем лиганде может быть заменен на N-трифторацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутирилгалактозамин или N-изобутирилгалактозамин.

В некоторых вариантах осуществления миРНК и нацеливающий лиганд связаны ковалентно или нековалентно.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец и/или 5'-конец смысловой цепи конъюгирован с нацеливающим лигандом.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с

нацеливающим лигандом.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан с концом миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы (сложной фосфодиэфирной группы) или фосфоротиоатной группы (сложной фосфодиэфирной группы).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан с 3'-концом смысловой цепи миРНК с помощью сложной фосфоэфирной группы (сложной фосфодиэфирной группы) или фосфоротиоатной группы (сложной фосфодиэфирной группы).

В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая цепь содержит любую из SEQ ID NO: 163 - SEQ ID NO: 188;

В некоторых конкретных вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит любую из SEQ ID NO: 217 - SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 290 - SEQ ID NO: 302.

В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 163 - SEQ ID NO: 188;

в некоторых конкретных вариантах осуществления антисмысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 217 - SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 290 - SEQ ID NO: 302.

В некоторых конкретных вариантах осуществления дцРНК или конъюгат миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, выбранную из любой из тех, которые показаны в Таблице 26.

В некоторых конкретных вариантах осуществления конъюгат дцРНК или миРНК выбран из любого из следующего:

дцРНК или конъюгат миРНК, или соединение по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 163, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 217; или

дцРНК или конъюгат миРНК, или соединение по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 172, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 226; или

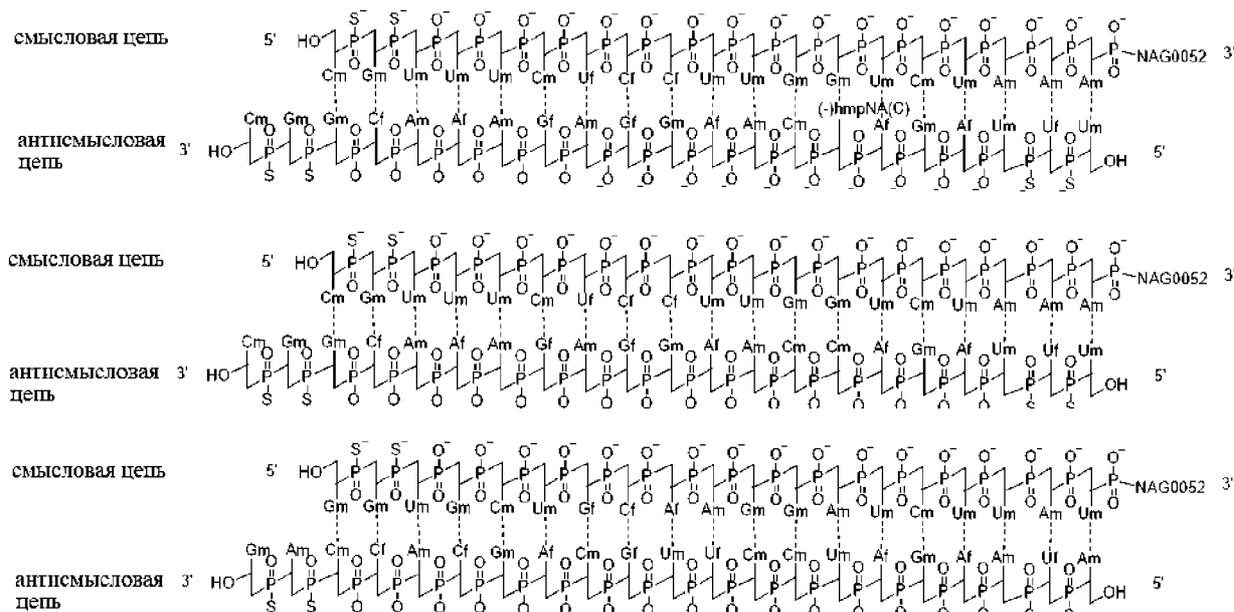
дцРНК или конъюгат миРНК, или соединение по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 173, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 227; или

дцРНК или конъюгат миРНК, или соединение по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 174, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 228; или

дцРНК или конъюгат миРНК, или соединение по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 175, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 229; или

дцРНК или конъюгат миРНК, или соединение по настоящему изобретению, где смысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 176, и антисмысловая цепь выбрана из SEQ ID NO: 230.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК или конъюгат миРНК имеет следующие структуры или их фармацевтически приемлемые соли:



где,

Af = аденин 2'-F рибонуклеозид;

Cf = цитозин 2'-F рибонуклеозид;

Uf = урацил 2'-F рибонуклеозид;

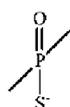
Gf = гуанин 2'-F рибонуклеозид;

Am = аденин 2'-ОМе рибонуклеозид;

Cm = цитозин 2'-ОМе рибонуклеозид;

Gm = гуанин 2'-ОМе рибонуклеозид;

Um = урацил 2'-ОМе рибонуклеозид.



представляет собой сложную фосфоротиоатную диэфирную группу,

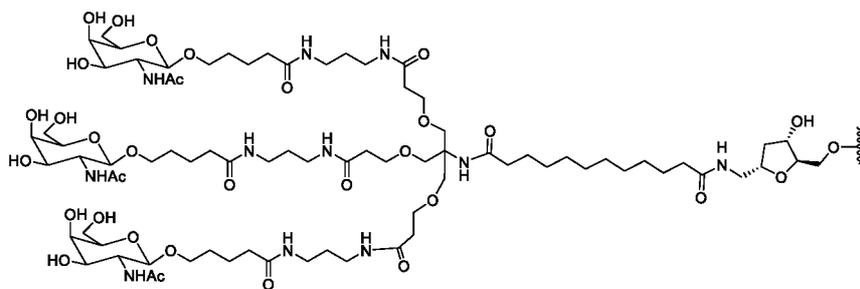
представляет собой сложную фосфодиэфирную группу,

NAG0052

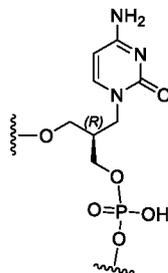
представляет



собой



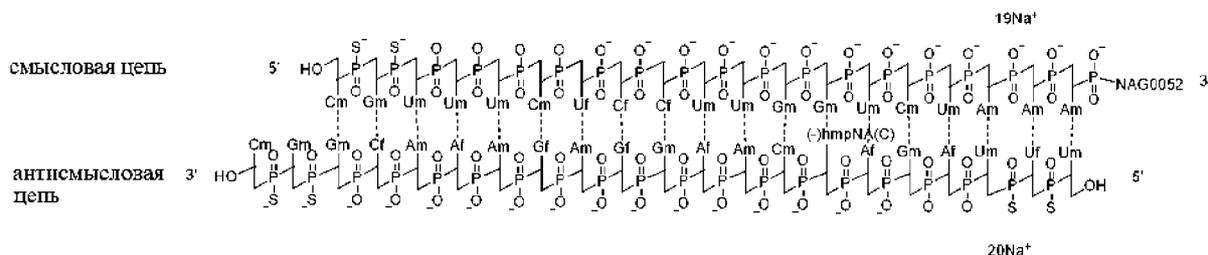
И



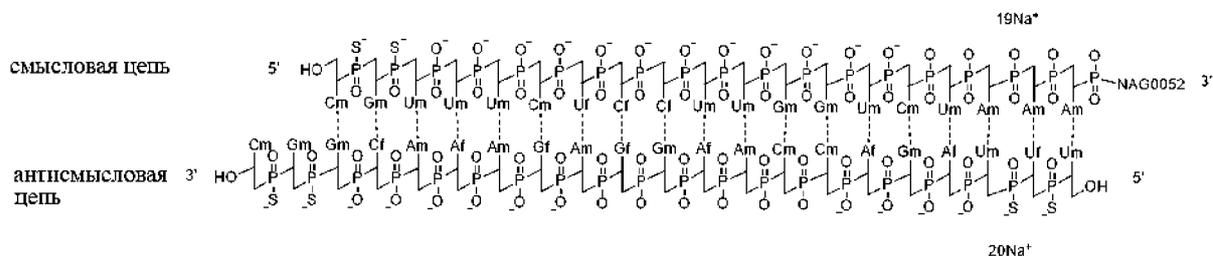
(-)hmpNA(C) представляет собой

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль может представлять собой обычную соль в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими: соли натрия, соли калия, соли аммония, соли аминов и т. д. В некоторых вариантах осуществления дцРНК или конъюгат миРНК выбран из группы, состоящей из TRD008096, TJR100053 и TJR100296.

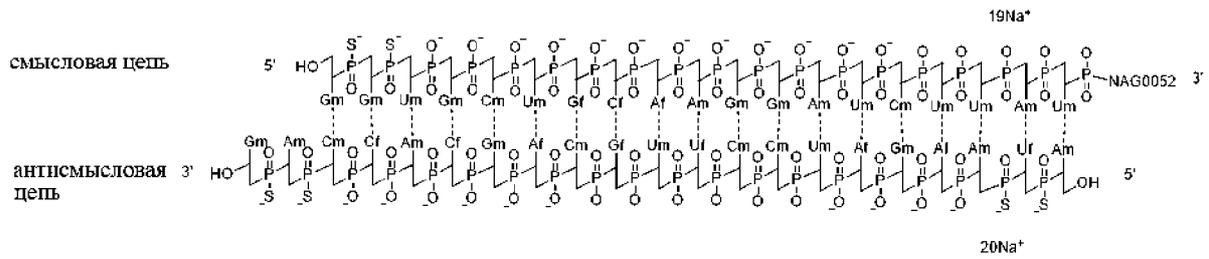
В некоторых вариантах осуществления дцРНК или конъюгат миРНК представляет собой TRD008096, который имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления дцРНК или конъюгат миРНК представляет собой TJR100053, который имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления дцРНК представляет собой TJR100296, который имеет следующую структуру:



где,

Af = аденин 2'-F рибонуклеозид;

Cf = цитозин 2'-F рибонуклеозид;

Uf = урацил 2'-F рибонуклеозид;

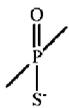
Gf = гуанин 2'-F рибонуклеозид;

Am = аденин 2'-ОМе рибонуклеозид;

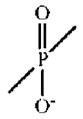
Cm = цитозин 2'-ОМе рибонуклеозид;

Gm = гуанин 2'-ОМе рибонуклеозид;

Um = урацил 2'-ОМе рибонуклеозид.



представляет собой сложную фосфоротриатную диэфирную группу,

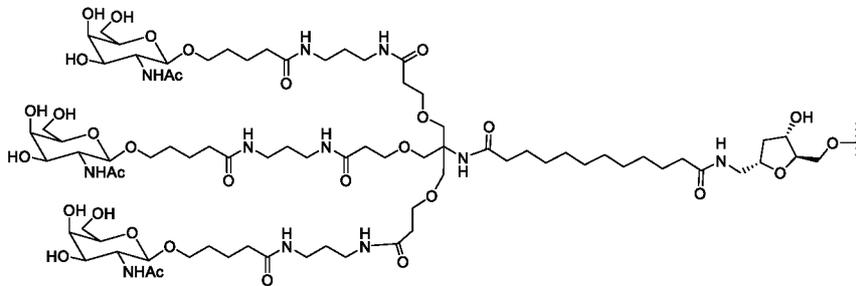


представляет собой сложную фосфодиэфирную группу,

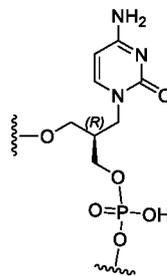
NAG0052

представляет

собой



и



(-)hmpNA(C) представляет собой

Другой аспект настоящего изобретения относится к соединению, выбранному из любой из групп 1) - 6):

группа 1), смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 7;

группа 2), смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 2, и антисмысловая цепь,

представленная в SEQ ID NO: 8;

группа 3), смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 9;

группа 4), смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 4, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 10;

группа 5), смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 11;

группа 6), смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 6, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 12.

Настоящее изобретение относится к соединению, содержащему смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 135 - SEQ ID NO: 162; антисмысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 189 - SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 243 - SEQ ID NO: 259 и SEQ ID NO: 273 - SEQ ID NO: 289.

Настоящее изобретение относится к соединению, содержащему смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 163 - SEQ ID NO: 188; антисмысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 217 - SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 290 - SEQ ID NO: 302.

Настоящее изобретение относится к соединению, которое содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, выбранную из любой из тех, которые показаны в Таблице 26.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, которая содержит миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или соединение, описанное в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, таких как носители, носители, разбавители и/или полимеры для доставки.

Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для миРНК, или конъюгата миРНК, или дцРНК согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать миРНК, или конъюгат миРНК, или дцРНК, опосредованные рецептором эндоцитоз и конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровируса или других векторов.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или композиции, описанных выше, при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта; в некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из заболевания печени.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения заболевания у субъекта, который включает введение субъекту миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или

композиции, описанных выше.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу ингибирования экспрессии мРНК у субъекта, который включает введение субъекту миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или композиции, описанных выше.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу доставки ингибирующего экспрессию олигомерного соединения в печень *in vivo*, который включает введение субъекту миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или композиции, описанных выше.

МиРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или композиция и способы, описанные в настоящем документе, могут снижать уровень целевой мРНК в клетке, популяции клеток, популяции клеток, ткани или субъекте, что включает: введение субъекту терапевтически эффективного количества миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или композиции, описанных в настоящем документе. МиРНК связана с нацеливающим лигандом, тем самым ингибируя экспрессию мРНК-мишени у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления субъект ранее был идентифицирован как имеющий патологическую активацию целевого гена в целевой клетке или целевой ткани.

Субъект, описанный в настоящем описании, относится к субъекту, имеющему (или предположительно имеющему или предрасположенному к нему) заболевание или состояние, которое выиграло бы от снижения или ингибирования экспрессии мРНК-мишени.

Доставка может быть осуществлена путем местного введения (например, прямой инъекции, имплантации или местного применения), системного введения или через подкожные, внутривенные, внутривенные или парентеральные пути, включая внутривенное (например, внутривенное, интрапаренхимальное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, дыхательные пути (аэрозольное), назальное, пероральное, ректальное или местное (включая буккальное и сублингвальное) введение.

В необязательных вариантах осуществления фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить путем инъекции, например, внутривенной, внутримышечной, внутрикожной, подкожной, внутривенной или внутривенной инъекции.

В необязательных вариантах осуществления после связывания нацеливающего лиганда и миРНК с образованием конъюгата, конъюгат может быть собран в набор.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит миРНК или конъюгат миРНК или дцРНК по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и/или

адьювант; вспомогательное вещество может представлять собой один или более различных составов или соединений, обычно используемых в данной области техники. Например, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может включать по меньшей мере один из рН-буфера, защитного агента и осмотического регулятора давления.

В некоторых вариантах осуществления, когда миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция, описанные выше, находится в контакте с клеткой, экспрессирующей ген-мишень, миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция, описанные выше, ингибируют экспрессию гена-мишени по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK, анализа репортерного гена люциферазы, PCR (полимеразная цепная реакция) или методов на основе разветвленной ДНК (рДНК), или способов на основе белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, например, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления, когда миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция, описанные выше, находится в контакте с клеткой, экспрессирующей ген-мишень, миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция, описанные выше, приводит к остаточной экспрессии мРНК гена-мишени в процентах не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более 65%, не более 60%, не более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более 25%, не более 20%, не более 15% или не более 10%, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK и анализа репортерного гена люциферазы, PCR или методов на основе разветвленной ДНК (рДНК), или способов на основе белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления, когда миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция находятся в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция снижает нецелевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере

на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75%, сохраняя при этом целевую активность, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK и анализа репортерного гена люциферазы, PCR или методов на основе разветвленной ДНК (рДНК), или способов на основе белка, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления, когда миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция находятся в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция снижает нецелевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75%, в то же время снижая целевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 5% или более чем на 1%, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK и анализа репортерного гена люциферазы, PCR или методов на основе разветвленной ДНК (bdDNA), или методов на основе белка, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления, когда миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция находятся в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, миРНК, конъюгат миРНК, дцРНК или фармацевтическая композиция снижает нецелевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75%, в то же время повышая целевую активность по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75% или по меньшей мере на 80%, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK и анализа репортера гена люциферазы, PCR или методов на основе разветвленной ДНК (bdDNA), или методов на основе белка, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-

блоттинг или проточная цитометрия.

Настоящее изобретение также относится к клетке, которая содержит миРНК или конъюгат миРНК или дцРНК по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к набору, который содержит миРНК или конъюгат миРНК или дцРНК по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу сайленсинга гена-мишени или мРНК гена-мишени в клетке, который включает стадию введения в клетку миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу сайленсинга гена-мишени или мРНК гена-мишени в клетке *in vivo* или *in vitro*, который включает стадию введения в клетку миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования экспрессии гена-мишени или мРНК гена-мишени, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества или эффективной дозы миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК и/или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляли посредством способов введения, включающих внутримышечное, внутрибронхиальное, внутривнеплевральное, внутрибрюшинное, внутриартериальное, лимфатическое, внутривенное, подкожное, цереброспинальное или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество или эффективная доза миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК и/или фармацевтической композиции составляет от около 0,001 мг/кг массы тела до около 200 мг/кг массы тела, от около 0,01 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела или от около 0,5 мг/кг массы тела до около 50 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления целевой ген представляет собой ген AGT.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит миРНК или конъюгат миРНК или дцРНК по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и/или адъювант; вспомогательное вещество может представлять собой один или более различных составов или соединений, обычно используемых в данной области техники. Например, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может включать по меньшей мере один из рН-буфера, защитного агента и осмотического регулятора давления.

В некоторых вариантах осуществления, когда конъюгат миРНК или дцРНК или фармацевтическая композиция, описанные выше, находятся в контакте с клеткой, экспрессирующей AGT, конъюгат миРНК или дцРНК или фармацевтическая композиция, описанные выше, ингибируют экспрессию AGT по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, как измерено, например, с помощью методов PCR или на основе разветвленной ДНК (рДНК), или методов на основе белка, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В некоторых вариантах осуществления, когда конъюгат миРНК или дцРНК, или фармацевтическая композиция, описанные выше, находится в контакт с клеткой, экспрессирующей AGT, конъюгат миРНК или дцРНК, или фармацевтическая композиция, описанные выше, приводит к остаточной экспрессии мРНК AGT в процентах не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более 65%, не более 60%, не более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более 25%, не более 20%, не более 15% или не более 10%, как измерено, например, с помощью методов PCR или методов на основе разветвленной ДНК (рДНК), или способов на основе белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

Настоящее изобретение относится к способу ингибирования экспрессии гена AGT, включающему введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к способу лечения и/или предотвращения заболевания, связанного с экспрессией гена AGT у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение относится к способу лечения и/или предотвращения заболевания, связанного с путем RAAS у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или

фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение относится к способу лечения и/или предотвращения заболевания, включающему введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы миРНК или конъюгата миРНК или дцРНК или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из гипертонии или сердечного заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из пограничной гипертонии, эссенциальной гипертонии, вторичной гипертонии, изолированной систолической или диастолической гипертонии, гипертонии, связанной с беременностью, диабетической гипертонии, резистентной гипертонии, рефрактерной гипертонии, пароксизмальной гипертонии, реноваскулярной гипертонии, гипертонии Гольдблатта, гипертонии, связанной с низкой активностью ренина в плазме или концентрацией ренина в плазме, глазной гипертонии, глаукомы, легочной гипертонии, портальной гипертонии, системной венозной гипертонии, систолической гипертонии, лабильной гипертонии; гипертонической болезни сердца, гипертонической нефропатии, атеросклероза, артериосклероза, васкулопатии, диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, хронической сердечной недостаточности, кардиомиопатии, диабетической кардиомиопатии, гломерулосклероза, коарктации аорты, аневризмы аорты, фиброза желудочка, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, стенокардии, порока клапана сердца, инсульта, инсульта, заболевания почек, почечной недостаточности, системного склероза, задержки внутриутробного развития (IUGR), задержки роста плода, ожирения, стеатоза печени/жировой дистрофии печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD); непереносимости глюкозы, диабета 2 типа (инсулиннезависимый сахарный диабет) и метаболического синдрома.

Настоящее изобретение относится к способу доставки миРНК, которая ингибирует экспрессию и/или репликацию гена AGT в печень *in vivo*, включающему введение субъекту миРНК или конъюгата миРНК или дцРНК или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

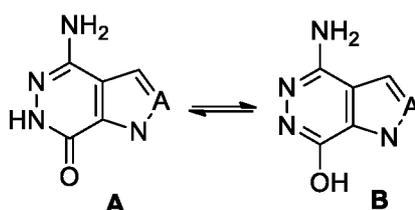
Настоящее изобретение также относится к способу получения миРНК или конъюгата миРНК или дцРНК, включающему синтез миРНК, конъюгата миРНК, дцРНК или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

В настоящем изобретении также предложена миРНК, или конъюгат миРНК, или дцРНК, где одно или более оснований U, например, 1, 2, 3, 3, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований U любой миРНК, или конъюгата миРНК, или дцРНК по настоящему изобретению заменены основаниями T.

Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в настоящем документе выбраны из группы, состоящей из неорганических солей и органических солей. Соединения, описанные в настоящем документе, могут реагировать с кислотными или основными веществами с образованием соответствующих солей.

В другом аспекте, где конфигурация не указана, соединения по настоящему изобретению могут присутствовать в конкретных геометрических или стереоизомерных формах. Настоящее изобретение рассматривает все такие соединения, включая цис- и транс-изомеры, (-)- и (+)-энантиомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереомеры, (D)-изомер, (L)-изомер и рацемические смеси и другие их смеси, такие как энантимерно или диастереомерно обогащенные смеси, все из которых находятся в пределах объема настоящего изобретения. Дополнительные асимметричные атомы углерода могут присутствовать в заместителях, таких как алкильная группа. Все такие изомеры и их смеси включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, где конфигурация не указана, соединения и промежуточные соединения по настоящему изобретению также могут присутствовать в различных таутомерных формах, и все такие формы включены в объем настоящего изобретения. Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам с различными энергиями, которые могут взаимно превращаться через низкоэнергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как таутомеры переноса протонов) включают взаимную конверсию посредством миграции протонов, такую как кето-енол и имин-энамин, изомеризацию лактам-лактима. Пример лактамно-лактимного равновесия присутствует между A и B, как показано ниже.



Все соединения в настоящем изобретении могут быть изображены как форма A или форма B. Все таутомерные формы находятся в пределах объема настоящего изобретения. Названия соединений не исключают каких-либо таутомеров.

Соединения по настоящему изобретению могут быть асимметричными; например, соединения имеют один или более стереоизомеров. Если не указано иное, все стереоизомеры включают, например, энантиомеры и диастереомеры. Соединения по настоящему изобретению, содержащие асимметричные атомы углерода, могут быть отделены в оптически активной чистой форме или в рацемической форме. Оптически активная чистая форма может быть выделена из рацемической смеси или синтезирована с

использованием хиральных исходных материалов или хиральных реагентов.

Оптически активные (R)- и (S)-энантиомеры и D-и L-изомеры могут быть получены с помощью хирального синтеза, хиральных реагентов или других обычных методов. Если требуется один энантиомер определенного соединения по настоящему изобретению, его можно получить путем асимметричного синтеза или дериватизации с хиральным вспомогательным веществом, где полученную смесь диастереомеров разделяли, а вспомогательную группу расщепляли с получением чистого желаемого энантиомера. Альтернативно, когда молекула содержит основную функциональную группу (например, амино) или кислотную функциональную группу (например, карбоксил), соли диастереомеров образуются с соответствующей оптически активной кислотой или основанием с последующим разрешением диастереомеров обычными способами, известными в данной области техники, и чистые энантиомеры получают путем восстановления. Кроме того, разделение энантиомеров и диастереомеров обычно осуществляли с помощью хроматографии с использованием хиральной стационарной фазы, необязательно в комбинации с химической дериватизацией (например, образованием карбамата из аминов).

Настоящее изобретение также включает меченые изотопами соединения, которые идентичны указанным в настоящем документе, но имеют один или более атомов, замещенных атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличающиеся от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, йода и хлора, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  и  $^{36}\text{Cl}$ .

Если не указано иное, когда положение конкретно назначено дейтерием (D), положение следует рассматривать как дейтерий с содержанием, которое по меньшей мере в 1000 раз превышает естественное содержание дейтерия (которое составляет 0,015%) (то есть по меньшей мере 10% включения дейтерия). Соединения примеров содержат дейтерий, имеющий содержание, которое превышает естественное содержание по меньшей мере в 1000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 2000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 3000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 4000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 5000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 6000 или более раз. Настоящее изобретение также включает различные дейтерированные формы соединений формулы I и формулы II. Каждый доступный атом водорода, соединенный с атомом углерода, может быть независимо замещен атомом дейтерия. Специалисты в данной области техники могут

синтезировать дейтерированные формы соединений формулы I и формулы II согласно соответствующей литературе. Коммерчески доступные дейтерированные исходные материалы могут быть использованы для получения дейтерированных форм соединения формулы I и формулы II, или они могут быть синтезированы с использованием общепринятых методик с дейтерированными реагентами, включая, но не ограничиваясь, дейтерированный боран, тридейтерированный боран в тетрагидрофуране, дейтерированный алюмогидрид лития, дейтерированный йодэтан, дейтерированный йодметан и тому подобное.

Если конфигурации не указаны, в химических структурах соединений по настоящему изобретению связь «/» указывает на неопределенную конфигурацию; то есть, если хиральные изомеры существуют в химических структурах, связь «/» может быть «.....» или «/», или включает обе конфигурации «.....» и «/». Хотя все вышеуказанные структурные формулы представлены в виде специфических изомерных форм для простоты, настоящее изобретение может включать все изомеры, такие как таутомеры, ротамеры, геометрические изомеры, диастереомеры, рацематы и энантиомеры. В химической структуре соединения по настоящему изобретению связь «//» не указывает конфигурацию; то есть конфигурация для связи «//» может быть конфигурацией E или конфигурацией Z, или включает в себя как конфигурацию E, так и конфигурацию Z.

#### Термины и определения

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если иное четко не указано в данном документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Если не указано иное, в контексте настоящего изобретения термины «ангиотензиноген» и «AGT» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. AGT также известен как SERPINA8 и ANHU. AGT включают, но не ограничиваются ими, AGT человека, AGT яванского макака, AGT мыши и AGT крысы, аминокислотные и полные кодирующие последовательности и последовательности мРНК которых легко доступны с использованием общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта генома Масаса.

Термин "AGT" также относится к встречающимся в природе вариациям последовательности ДНК гена AGT, таким как однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене AGT. Иллюстративные SNP можно найти в базе данных dbSNP.

Термин "целевая последовательность" относится к смежной части нуклеотидной

последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена AGT, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК продукта первичной транскрипции. Целевая часть в целевой последовательности должна быть достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для iRNA-направленного расщепления. В одном варианте осуществления целевая последовательность находится в области, кодирующей белок AGT.

В контексте РНК-опосредованного сайленсинга генов в настоящем документе смысловая цепь (также называемая SS или SS цепь) миРНК относится к цепи, которая содержит последовательность, идентичную или по существу идентичную последовательности мРНК-мишени; антисмысловая цепь (также называемая AS или AS цепь) миРНК относится к цепи, имеющей последовательность, комплементарную последовательности мРНК-мишени.

В контексте описания смысловой цепи миРНК, описанной в настоящем документе, термин «последовательность, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 и содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов» предназначен для обозначения того, что смысловая цепь миРНК, описанная в настоящем документе, содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей в SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 или последовательность, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида (необязательно, не более чем на 2 нуклеотида; необязательно, на 1 нуклеотид) от по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей в SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6. Необязательно, смысловая цепь миРНК, описанная в настоящем документе, содержит по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6 или последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида (необязательно, не более чем на 2 нуклеотида; необязательно, на 1 нуклеотид) от по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 6.

В контексте описания антисмысловой цепи миРНК, описанной в настоящем документе, термин «последовательность, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых цепей SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12 и содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов» предназначен для обозначения того, что антисмысловая цепь миРНК, описанная в настоящем документе, содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из антисмысловых цепей в SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12 или последовательность, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида (необязательно, не более чем на 2 нуклеотида; необязательно, на 1 нуклеотид) от по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из антисмысловых цепей в SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12.

В настоящем изобретении «5'-область» смысловой или антисмысловой цепи, то есть «5'-конец», используется взаимозаменяемо. Например, нуклеотиды в положениях 2-8 5'-области антисмысловой цепи могут быть заменены нуклеотидами в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи. Аналогично, «3'-область», «3'-концевая» и «3'-конец» смысловой или антисмысловой цепи также используются взаимозаменяемо.

Если не указано иное, в контексте настоящего изобретения буквы C, G, U, A и T в верхнем регистре представляют базовые компоненты нуклеотида; буква d в нижнем регистре указывает, что нуклеотид, расположенный ниже и примыкающий к букве d, представляет собой дезоксирибонуклеотид; буква m в нижнем регистре указывает, что нуклеотид, расположенный выше и примыкающий к букве m, представляет собой метокси-модифицированный нуклеотид; буква f в нижнем регистре указывает, что нуклеотид, расположенный выше и примыкающий к букве f, представляет собой фтор-модифицированный нуклеотид; буква s в нижнем регистре указывает, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны фосфоротиоатной группой.

В данном описании термин "2'-фтор-модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, в котором гидроксильная группа в 2' положении рибозильной группы нуклеотида замещена фтором, а термин "не-2'-фтор-модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду или нуклеотидному аналогу, в котором гидроксильная группа в 2' положении рибозильной группы нуклеотида замещена нефторсодержащей группой.

В данном описании термин "2'-метокси-модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, в котором 2'-гидроксильная группа рибозильной группы замещена метокси группой.

В данном контексте термины «комплементарный» и «обратно комплементарный» используются взаимозаменяемо и имеют значение, хорошо известное специалистам в данной области техники, то есть в двухцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты основания одной цепи соединены взаимодополняющим образом с основаниями другой цепи. В ДНК пуриновое основание аденин (A) всегда соединяется с пиримидиновым основанием тимин (t) (или урацил (U) в РНК), а пуриновое основание гуанин (C) всегда спаривается с пиримидиновым основанием цитозин (G). Каждая пара оснований содержит пурин и пиримидин. Когда аденины одной цепи всегда соединяются с тиминами (или урацилами) другой цепи, а гуанины всегда соединяются с цитозинами, две цепи считаются комплементарными друг другу, и последовательности цепей могут быть выведены из последовательностей их комплементарных цепей. Соответственно, «несоответствие» в данной области техники означает, что в двухцепочечной нуклеиновой кислоте основания в соответствующих положениях не спариваются комплементарным образом.

В данном контексте термин «ингибирование» используется взаимозаменяемо с

терминами «снижение», «сайленсинг», «подавляющая регуляция», «подавление» и другими аналогичными терминами и включает любой уровень ингибирования. Ингибирование может быть оценено с точки зрения снижения абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных относительно контрольного уровня. Контрольный уровень может быть любым типом контрольного уровня, используемого в данной области техники, таким как базовый уровень до введения дозы или уровень, определенный из необработанного или контрольного (например, только буферный контроль или контроль инертного агента) обработанного субъекта, клетки или образца. Например, оставшийся уровень экспрессии мРНК может быть использован для характеристики степени ингибирования экспрессии гена-мишени миРНК; например, остаточный уровень экспрессии мРНК составляет не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более не более 65%, не более 60%, не более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более 25 %, не более 20 %, не более 15 % или не более 10 %. Ингибирование экспрессии целевого гена может быть измерено с использованием системы анализа люциферазы Dual-Glo®: считывали показатель хемилюминесценции светлячка (Fir) и значение хемилюминесценции рениллы (Ren) и вычисляли относительное значение  $\text{Соотношение} = \text{Ren}/\text{Fir}$ ; в настоящем изобретении отношение остаточного уровня экспрессии мРНК (или остаточной активности%) =  $\text{Соотношение (группа, обработанная миРНК)}/\text{Соотношение (контрольная группа, не содержащая миРНК)}$  и степень ингибирования (%) =  $100\% - \text{остаточный уровень экспрессии мРНК (\%)}$ .

Если не указано иное, «соединение», «лиганд», «конъюгат нуклеиновая кислота-лиганд», «нуклеиновая кислота», «конъюгат», «химическая модификация», «лиганд», «дцРНК» и «РНКи» согласно настоящему изобретению могут каждый независимо существовать в форме соли, смешанных солей или несолевой форме (например, свободной кислоты или свободного основания). Когда они существуют в форме соли или смешанных солей, они могут представлять собой фармацевтически приемлемую соль.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» включает фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты и фармацевтически приемлемые соли присоединения основания.

«Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» относится к солям, которые способны сохранять биологическую эффективность свободных оснований без каких-либо нежелательных эффектов и которые образуются с неорганическими или органическими кислотами. Соли неорганических кислот включают, но не ограничиваются, гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, нитраты, фосфаты и т.д.; соли органических

кислот включают, но не ограничиваются ими, формиаты, ацетаты, 2,2-дихлорацетаты, трифторацетаты, пропионаты, капроаты, каприлаты, капраты, ундеценаты, гликоляты, глюконаты, лактаты, себацинаты, адипаты, глутараты, малонаты, оксалаты, малеаты, сукцинаты, фумараты, тартраты, цитраты, пальмитаты, стеараты, олеаты, циннаматы, лаураты, малаты, глутаматы, пироглутаматы, аспартаты, бензоаты, мезилаты, бензолсульфонаты, пара-толуолсульфонаты, альгинаты, аскорбаты, салицилаты, 4-аминосалицилаты, нападисилаты, и т.д. Эти соли могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

«Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания» относится к солям, которые способны сохранять биологическую эффективность свободных кислот без каких-либо нежелательных эффектов и которые образуются с неорганическими основаниями или органическими основаниями. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, но не ограничиваются ими, соли натрия, соли калия, соли лития, соли аммония, соли кальция, соли магния, соли железа, соли цинка, соли меди, соли марганца, соли алюминия и т.д. Предпочтительными неорганическими солями являются соли аммония, соли натрия, соли калия, соли кальция и соли магния; натриевые соли являются предпочтительными. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются ими, соли следующих веществ: первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как аммиак, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, диметилэтанолламин, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурин, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы и др. Предпочтительные органические основания включают изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин. Эти соли могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

«Эффективное количество» или «эффективная доза» относится к количеству лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции, необходимого для получения любого одного или более полезных или желаемых терапевтических результатов. Для превентивного применения полезные или желаемые результаты включают устранение или снижение риска, снижение тяжести или задержки начала состояния, включая биохимию, гистологию и/или поведенческие симптомы состояния, их осложнения и промежуточные патологические фенотипы, которые появляются во время

прогрессирования состояния. Для терапевтических применений полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как снижение частоты возникновений различных состояний, связанных с целевым геном, целевой мРНК или целевым белком по настоящему изобретению, или облегчение одного или более симптомов состояния, снижение дозы других агентов, необходимых для лечения состояния, усиление терапевтического эффекта другого агента и/или задержка прогрессирования состояний, связанных с целевым геном, целевой мРНК или целевым белком по настоящему изобретению у пациента.

В данном контексте термины "пациент", "субъект" и "индивидуум" используются взаимозаменяемо и включают людей или животных, не являющихся людьми, например, млекопитающих, например, людей или обезьян.

МиРНК, предложенная в настоящем описании, может быть получена с использованием способа получения, известного в данной области техники (например, твердофазный синтез и жидкофазный синтез). Твердофазный синтез был коммерчески доступен в качестве услуги по настройке по требованиям заказчика. Модифицированная нуклеотидная группа может быть введена в миРНК по настоящему изобретению с использованием нуклеозидного мономера с соответствующей модификацией. Способы получения нуклеозидного мономера с соответствующей модификацией и введения модифицированной нуклеотидной группы в миРНК также хорошо известны специалистам в данной области техники.

Термин «химическая модификация» или «модификация» включает все изменения, внесенные в нуклеотид химическими средствами, такие как добавление или удаление химического фрагмента или замена одного химического фрагмента другим.

Термин «основание» охватывает любые известные основания ДНК и РНК и аналоги оснований, такие как пурины или пиримидины, и также включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и природные аналоги.

Термин «тупой» и «тупой конец» используется взаимозаменяемо и означает, что на данном конце миРНК нет непарных нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, то есть нет нуклеотидного липкого конца. В большинстве случаев миРНК, оба конца которой являются тупыми, будет двуцепочечной по всей своей длине.

Термины «около» и «приблизительно», означают, что числовое значение находится в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, и числовое значение частично зависит от того, как измеряется или определяется значение (т.е. ограничения измерительной системы). Например, "около" может означать стандартное отклонение в пределах 1 или более чем 1. В

альтернативном варианте «около» или «содержащий по существу» может означать диапазон не более 20%, например, изменение от 1 до 15%, от 1 до 10%, от 1 до 5%, от 0,5 до 5% или от 0,5 до 1%. В настоящем описании каждый случай, когда число или числовой диапазон предшествует термину «около», также включает вариант осуществления данного числа. Если не указано иное, когда конкретное значение представлено в настоящей заявке и формуле изобретения, значение «около» или «по существу содержащий» следует понимать как находящееся в пределах допустимого диапазона погрешности для этого конкретного значения.

Если не указано иное, "необязательно", "необязательный", "альтернативно" или "альтернативный" означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но не обязательно, иметь место, и что это описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «необязательно,  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца» означает, что  $R_1$  и  $R_2$ , непосредственно связанные с образованием кольца, могут возникать, но не обязательно существуют, и это описание включает случай, когда  $R_1$  и  $R_2$  непосредственно связаны с образованием кольца, и случай, когда  $R_1$  и  $R_2$  не образуют кольцо.

В настоящем изобретении термин «содержать» может быть заменен на «состоять из».

Термин "алкил" относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой группу с прямой или разветвленной цепью, содержащую от 1 до 20 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления он выбран из группы, состоящей из алкильных групп, содержащих от 1 до 12 атомов углерода. Неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, н-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, н-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их различные изомеры с разветвленной цепью, и т. п. В некоторых вариантах осуществления его выбирали из группы, состоящей из

алкильных групп, содержащих от 1 до 6 атомов углерода; неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил и тому подобное. Алкил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения; заместитель в некоторых вариантах осуществления изобретения выбран из группы, состоящей из одной или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио, оксо, карбоксила или карбоксилатной группы.

Термин "алкокси" относится к -O-(алкилу) и -O-(незамещенному циклоалкилу), где алкильная группа является такой, как определено выше. Неограничивающие примеры алкокси группы включают: метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропокси, циклобутокси, циклопентилокси и циклогексилокси. Алкокси может быть необязательно замещен или незамещен, и когда он замещен, заместитель в некоторых вариантах осуществления выбран из группы, состоящей из одной или более следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро, циано, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилокси, C<sub>2-6</sub> алкинилокси, C<sub>3-6</sub> циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C<sub>3-8</sub>-циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C<sub>1-6</sub>-алкил, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилокси, C<sub>2-6</sub> алкинилокси, C<sub>3-6</sub> циклоалкокси, 3-6-членный гетероциклоалкокси, C<sub>3-8</sub> циклоалкенилокси и 5-6-членный арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро и циано. Аналогично, определения «алкинилокси», «алкенилокси», «циклоалкокси», «гетероциклоалкокси» и «циклоалкенилокси» аналогичны приведенному выше определению «алкокси».

Термин "алкенил" относится к неароматической углеводородной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь и содержащей 2-10 атомов углерода. В таких группах может присутствовать до 5 углерод-углеродных двойных связей. Например, "C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" алкенил определяется как алкенильная группа, имеющая 2-6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими: этенил, пропенил, бутенил и циклогексенил. Прямая, разветвленная или циклическая часть алкенильной группы может

содержать двойную связь и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любом положении, допускаемом нормальной валентностью.

Термин "циклоалкенил" относится к моноциклической углеводородной группе, содержащей указанное количество атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

Термин «алкинил» относится к углеводородной группе с прямой или разветвленной цепью, содержащей 2-10 атомов углерода и содержащей по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод. Может присутствовать до 5 углерод-углеродных тройных связей. Таким образом, "C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил" относится к алкенильной группе, имеющей 2-6 атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают, но не ограничиваются ими: этинил, 2-пропинил и 2-бутинил. Прямая или разветвленная часть алкинильной группы может содержать тройную связь, допускаемую нормальной валентностью, и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любом положении, допускаемом нормальной валентностью.

Термин "кето" относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклической, гетероарильной или арильной группе, как описано в настоящем документе, присоединенной через карбонильный мостик. Примеры кетогрупп включают, но не ограничиваются ими: алканоил (например, ацетил, пропионил, бутирил, пентаноил, гексаноил), алкеноил (например, акрилоил), алкиноил (например, этиноил, пропиноил, бутиноил, пентиноил, гексиноил), ароил (например, бензоил), гетероароил (например, пирролоил, имидазолил, хинолиноил, пиридиноил).

Термин "алкоксикарбонил" относится к любой алкоксигруппе, как определено выше, присоединенной через карбонильный мостик (т.е. -C(O)O-алкил). Примеры алкоксикарбонильных групп включают, но не ограничиваются ими: метоксикарбонил, этоксикарбонил, изопропоксикарбонил, н-пропоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или н-пентоксикарбонил.

Термин "арилоксикарбонил" относится к любой арильной группе, как определено выше, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е. -C(O)O-арил). Примеры арилоксикарбонильных групп включают, но не ограничиваются ими: феноксикарбонил и нафтилоксикарбонил.

Термин "гетероарилоксикарбонил" относится к любой гетероарильной группе, как определено выше, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е. -C(O)O-гетероарил). Примеры гетероарилоксикарбонильных групп включают, но не ограничиваются ими: 2-пиридилоксикарбонил, 2-оксазолилоксикарбонил, 4-

тиазолилоксикарбонил или пиримидинилоксикарбонил.

Термин "циклоалкил" или "карбоцикл" относится к насыщенному или частично ненасыщенному, моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю; циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления он выбран из группы, состоящей из атомов углерода, содержащих от 3 до 7. Неограничивающие примеры моноциклических циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексаденил и т. д. Полициклические циклоалкильные группы включают спиро, конденсированные и мостиковые циклоалкильные группы. Циклоалкил может быть замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения. В некоторых вариантах осуществления он выбран из группы, состоящей из одной или более следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро, циано, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилокси, C<sub>2-6</sub> алкинилокси, C<sub>3-6</sub> циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C<sub>3-8</sub>-циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C<sub>1-6</sub>-алкил, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилокси, C<sub>2-6</sub> алкинилокси, C<sub>3-6</sub> циклоалкокси, 3-6-членный гетероциклоалкокси, C<sub>3-8</sub> циклоалкенилокси и 5-6-членный арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро и циано.

Циклоалкильное кольцо может быть конденсировано с арильным или гетероарильным кольцом, где кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой циклоалкильную группу; неограничивающие примеры включают инданил, тетрагидронафтил, бензоциклогептил и тому подобное. Циклоалкил может быть необязательно замещен или незамещен, и когда он замещен, заместитель в некоторых вариантах осуществления выбран из группы, состоящей из одной или более следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро, циано, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилокси, C<sub>2-6</sub> алкинилокси, C<sub>3-6</sub> циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C<sub>3-8</sub>-циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C<sub>1-6</sub>-алкил, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилокси, C<sub>2-6</sub> алкинилокси, C<sub>3-6</sub> циклоалкокси, 3-6-членный гетероциклоалкокси, C<sub>3-8</sub> циклоалкенилокси и 5-6-членный арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро и циано.

Термин "гетероциклоалкил", или "гетероцикл", или "гетероциклил" относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю, содержащему от 3 до 20 кольцевых атомов, где один или



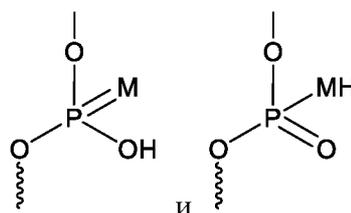
Термин "карбоксил" относится к  $-C(O)OH$ .

Термин "альдегид" относится к  $-CHO$ .

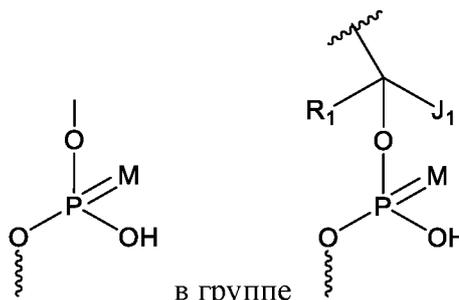
В химических структурных формулах согласно настоящему изобретению «» или  может быть связано с любой группой или группами в соответствии с объемом изобретения, описанного в настоящем документе; звездочка «\*» указывает на хиральный центр.

В настоящем изобретении «сложная фосфоэфирная группа» представляет собой сложную фосфодиэфирную группу, если не указано иное.

В настоящем изобретении фосфоротиоатная группа относится к сложной фосфодиэфирной группе, модифицированной путем замены одного немостикового атома



кислорода атомом серы, и используется взаимозаменяемо с  и  (M представляет собой атом S).



В контексте настоящего изобретения  в группе  может быть заменен любой группой, способной связываться с соседним нуклеотидом.

Термин «связывать», «соединять» или «присоединять», когда он относится к взаимосвязи между двумя молекулами, означает, что две молекулы связаны ковалентной связью или что две молекулы связаны нековалентной связью (например, водородной связью или ионной связью), и включает прямую связь и косвенную связь.

Термин «непосредственно связанный» означает, что первое соединение или группа связаны со вторым соединением или группой без какого-либо атома или группы атомов, расположенных между ними.

Термин «косвенно связанный» означает, что первое соединение или группа связаны со вторым соединением или группой промежуточной группой, соединением или молекулой (например, связывающей группой).

Термин "замещенный" означает, что любой один или более атомов водорода на указанном атоме (обычно атоме углерода, кислорода или азота) замещены любой группой, как определено в настоящем документе, при условии, что нормальная валентность

указанного атома не превышена и что замещение приводит к стабильному соединению. Неограничивающие примеры заместителей включают C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил, циано, гидроксид, оксо, карбоксил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероцикл, гетероарил, арил, кето, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, гетероарилоксикарбонил или галогены (например, F, Cl, Br, I). Когда заместитель представляет собой кетон или оксо (т.е. =O), тогда замещают два (2) атома водорода.

"Замещенный одним или более" означает, что он может быть замещен одним заместителем или несколькими заместителями. В случае замены множеством заместителей может существовать множество идентичных заместителей или одна комбинация или множество комбинаций различных заместителей.

Некоторые сокращения в настоящем изобретении определены следующим образом:

DCE: дихлорэтан;

Sc(OTf)<sub>3</sub>: трифторметансульфонат скандия;

TFH: тетрагидрофуран;

Pd/C: палладий-углерод;

TFA: трифторуксусная кислота;

DMF: диметилформамид;

DIPEA: N-этилдиизопропиламин;

HoBt: 1-гидроксибензотриазол;

EDCI: гидрохлорид 1-этил-(3-диметиламинопропил)карбодиимида;

DMTrCl: 4,4-диметокситритилхлорид;

DI EA: N,N-диизопропилэтиламин;

HATU: 2-(7-азабензотриазол)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат;

LiOH: гидроксид лития;

DMAP: 4-диметиламинопиридин;

HBTU: бензотриазол-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат;

DMTrCl: 1-[хлор(4-метоксифенил)бензил]-4-метоксибензол;

CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H: трифторметансульфоновая кислота;

BnBr: бензилбромид;

DEPBT: 3-(диэтоксифосфорилокси)-1,2,3-бензотриазин-4-он;

Bz: бензоильная защитная группа;

MMTr: метоксифенилдифенилметил;

DMTr: диметокситритильная защитная группа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показаны уровни экспрессии мРНК TTR (ген белка транстиретин) на 7 день после введения TRD002218 и TRD007205.

На фиг. 2 показаны уровни экспрессии мРНК TTR на 28 день после введения TRD002218 и TRD007205.

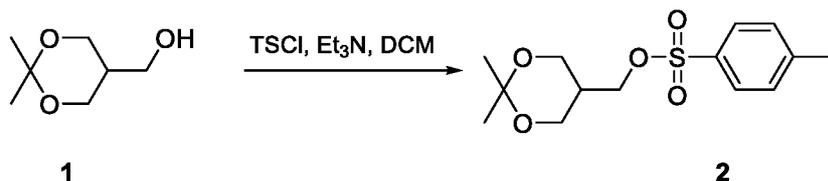
## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, однако эти примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Экспериментальные методы без условий, указанные в примерах настоящего изобретения, как правило, проводили в стандартных условиях или в условиях, рекомендованными производителем исходных материалов или коммерческих продуктов. Где источник реагента не указан, реагент можно получить от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии с уровнем качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

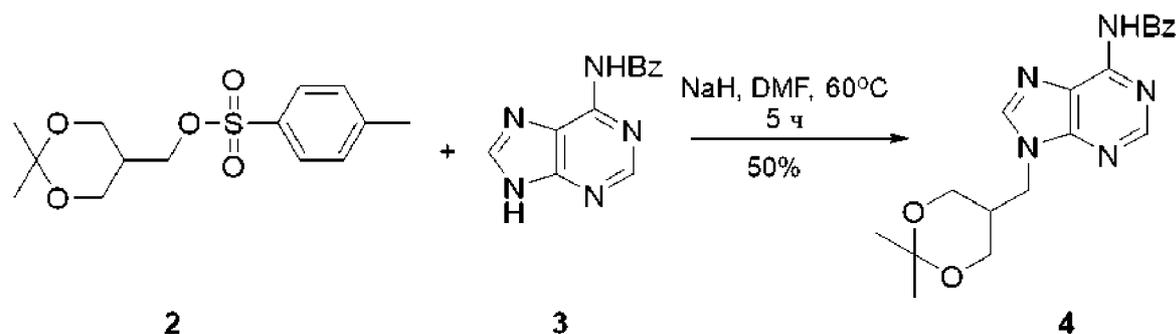
### Часть первая. Анти-нецелевые модификации

#### Пример 1. Получение химических модификаций

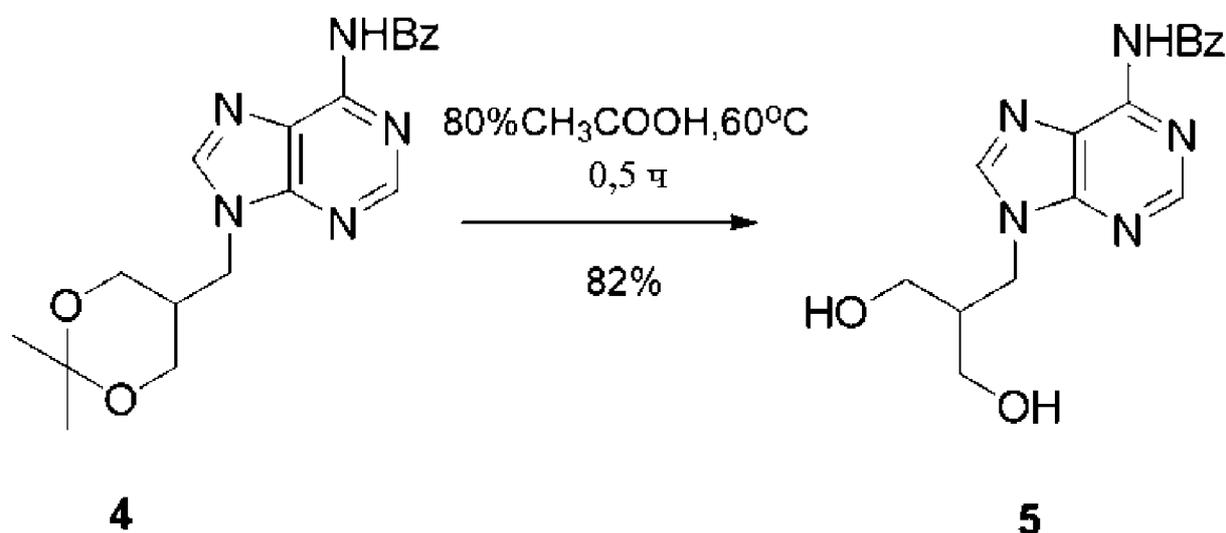
##### 1.1. Синтез соединения 1-1a и соединения 1-1b



Соединение 1 (500 мг, 3,42 ммоль) и триэтиламин (Et<sub>3</sub>N, 692 мг, 6,84 ммоль, 0,95 мл) растворяли в дихлорметане (DCM, 10 мл). Раствор 4-толуолсульфонилхлорида (TsCl, 717 мг, 3,76 ммоль) в дихлорметане (10 мл) добавляли по каплям в условиях ледяной бани. После добавления по каплям смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь гасили водой. Водную фазу трижды экстрагировали дихлорметаном (15 мл). Объединенные органические фазы сначала промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), а затем насыщенным рассолом (20 мл), а затем концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением неочищенного продукта 2 (820 мг, 80%). Неочищенный продукт непосредственно использовали на следующей стадии. MS (масс-спектрометрия) m/z(масса/заряд): C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>S, [M+H]<sup>+</sup> рассчитано: 301,10, обнаружено: 301,2.

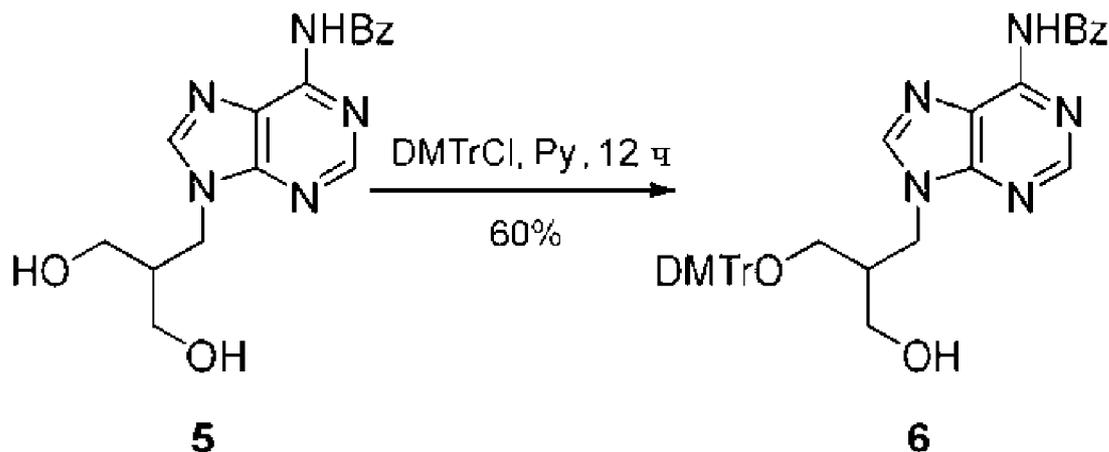


Соединение 3 (239 мг, 1,22 ммоль) растворяли в диметилформамиде (DMF, 10 мл). Раствор NaH (60% в минеральном масле, 93 мг, 2,33 ммоль) добавляли в условиях ледяной бани. Смесь перемешивали в течение 30 мин, а затем по каплям добавляли соединение 2 (350 мг, 1,16 ммоль). После добавления по каплям смесь перемешивали при 60 °С в течение 5 ч. После завершения реакции реакционную смесь гасили водой. Водную фазу трижды экстрагировали этилацетатом (15 мл). Объединенные органические фазы сначала трижды промывали водой (10 мл), а затем насыщенным солевым раствором (10 мл), а затем концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография) (C<sup>18</sup>, условия: 5-50% (A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 4 (220 мг). MS m/z: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup> рассчитано: 390,16, обнаружено: 390,3.

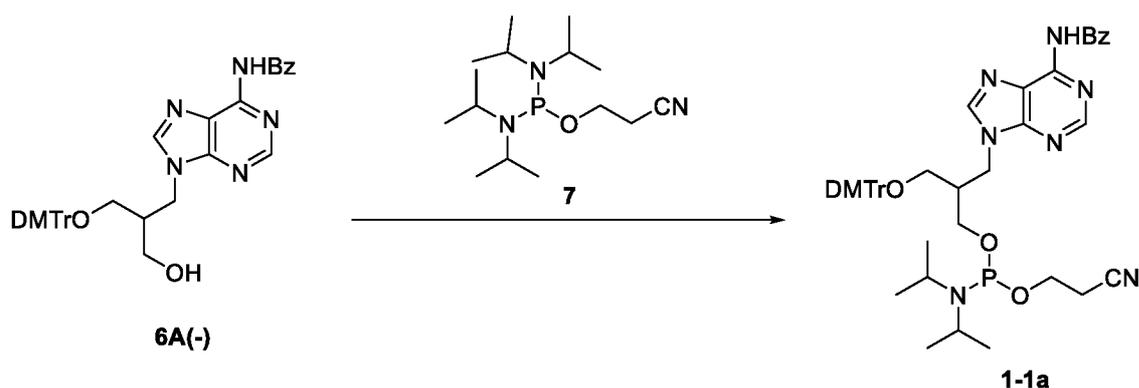


Соединение 4 (1,50 г, 4,08 ммоль) растворяли в 20 мл смешанного раствора уксусной кислоты и воды (4:1) при комнатной температуре и перемешивали смесь при 60 °С в течение 30 мин. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC (C<sup>18</sup>, условия: 5-25% (A: H<sub>2</sub>O, B: CH<sub>3</sub>CN), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 5 (1,10 мг). MS m/z: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>, [M

$+H]^+$  рассчитано: 328,13, обнаружено: 328,4.

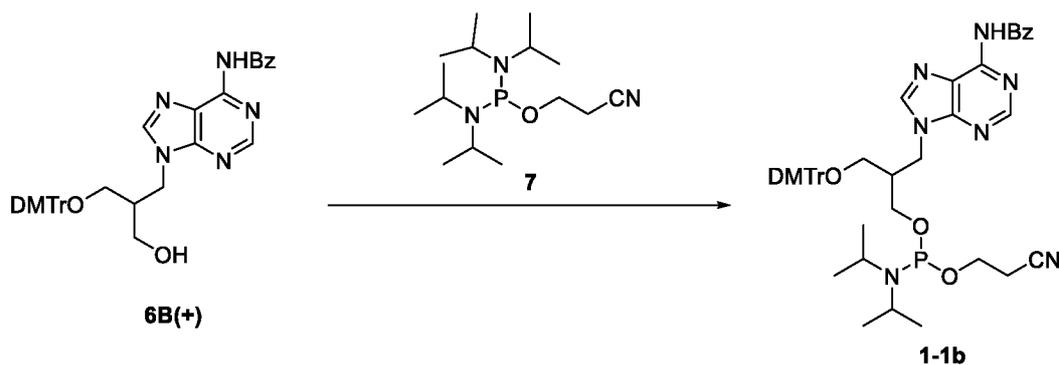


Соединение 5 (1,00 г, 3,05 ммоль) растворяли в пиридине (Py, 10 мл). Раствор 4,4'-диметокситритил хлорида (DMTrCl, 1,50 г, 4,58 ммоль) в пиридине (5 мл) добавляли по каплям в условиях ледяной бани. После добавления по каплям смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции реакцию смесь гасили водой и концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC ( $C^{18}$ , условия: 5-80% (A:  $H_2O$ , B:  $CH_3CN$ ), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 6 (1,00 мг). MS m/z:  $C_{37}H_{36}N_5O_5$ ,  $[M-H]^+$  рассчитано: 630,26, обнаружено: 630,5. Рацемическое соединение 6 разделяли с использованием хиральной колонки (Daicel CHIRALPAK® IE 250 × 4,6 мм, 5 мкм, A: н-гексан, B: этанол) с получением 6A(-) (410 мг) и 6B(+). (435 мг).



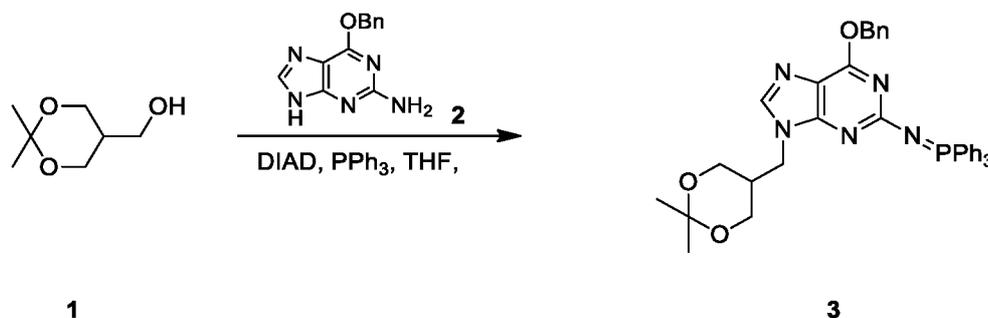
Соединение 6A(-) (200 мг, 0,32 ммоль), тетразол (11 мг, 0,16 ммоль), N-метилимидазол (5 мг, 0,06 ммоль) и молекулярное сито 3A (500 мг) растворяли в 10 мл ацетонитрила. Соединение 7 (144 мг, 0,48 ммоль) добавляли при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли дихлорметан (30 мл). Смесь трижды промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), а затем

насыщенным рассолом (20 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC (C<sup>18</sup>, условия: 5-100% (А: вода, В: CH<sub>3</sub>CN), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 1-1a (200 мг). MS m/z: C<sub>40</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P, [M-диизопропил+OH]<sup>+</sup> рассчитано: 747,26, обнаружено: 747,6. <sup>1</sup>H NMR (спектроскопия ядерного магнитного резонанса) (400 МГц, ацетонитрил-d<sub>3</sub>) δ 7,56, 7,54 (2s, 1H), 7,36-7,27 (m, 2H), 7,24-7,21 (m, 7H), 6,83-6,80 (m, 4H), 4,12-4,10 (m, 2H), 3,75-3,68 (m, 10H), 3,20-2,80 (m, 2H), 2,68-2,54 (m, 4H), 1,22-1,04 (m, 18H).



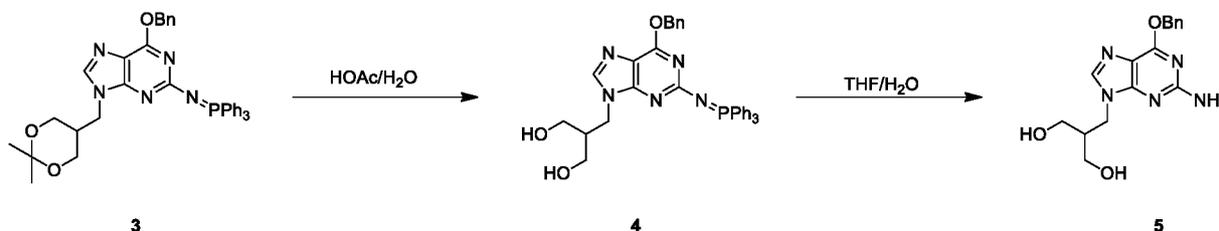
Соединение 6B(+), тетразол (11 мг, 0,16 ммоль), N-метилимидазол (5 мг, 0,06 ммоль) и молекулярное сито 3А (500 мг) растворяли в 10 мл ацетонитрила. Соединение 7 (144 мг, 0,48 ммоль) добавляли при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли дихлорметан (30 мл). Смесь трижды промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), а затем насыщенным рассолом (20 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC (C<sup>18</sup>, условия: 5-100% (А: вода, В: CH<sub>3</sub>CN), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 1-1b (200 мг). MS m/z: C<sub>40</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P, [M-диизопропил+OH]<sup>+</sup> рассчитано: 747,26, обнаружено: 747,5.

### 1.2. Синтез соединения 1-6a

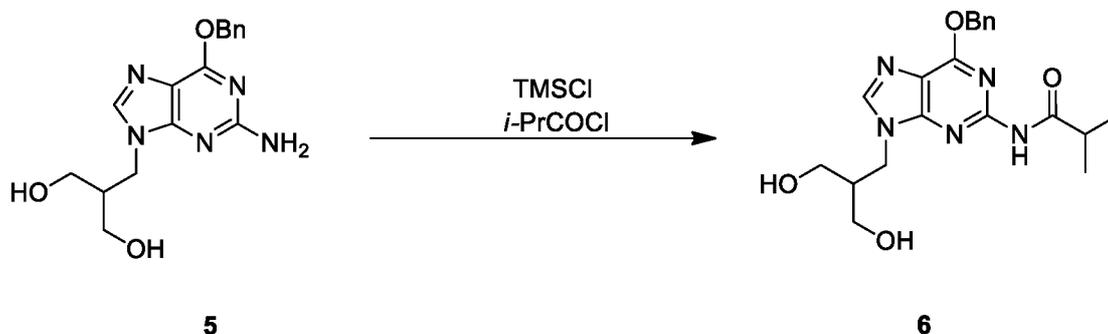


Соединение 1 (10 г, 68,404 ммоль), соединение 2 (15 г, 62,186 ммоль) и трифенилфосфин (32,62 г, 124,371 ммоль) растворяли в безводном THF (30 мл). DIAD

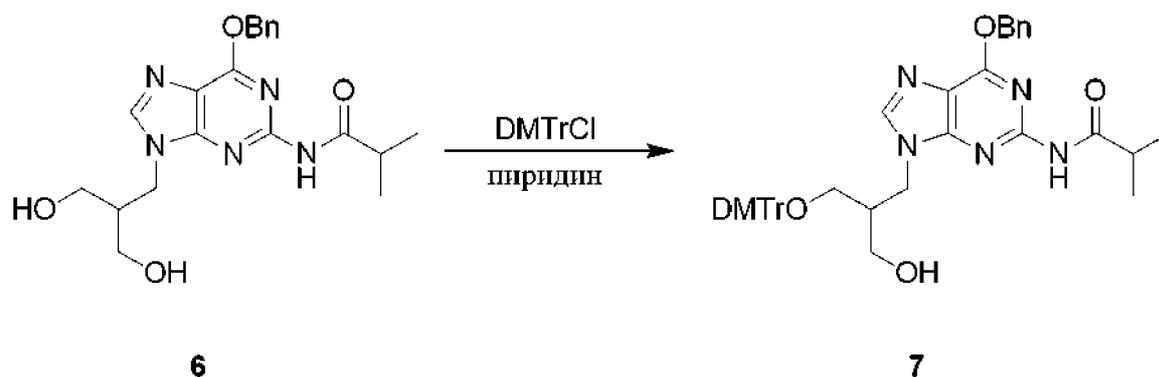
(24,656 мл, 124,371 ммоль) медленно добавляли по каплям при 0 °С. Реакционную смесь оставляли реагировать при 25 °С в течение 12 часов, и анализ LCMS (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией) показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (200 мл) и водой (200 мл). Органическую фазу сушили. Фильтрат концентрировали и полученный остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (DCM/MeOH = 10/1) с получением целевого продукта 3 (20 г).



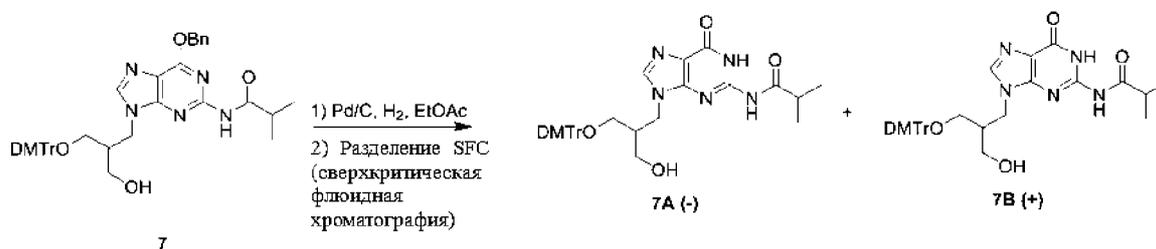
Соединение 3 (20 г, 28,585 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (24 мл, 426,016 ммоль) и H<sub>2</sub>O (12 мл). Смесь перемешивали при 60 °С в течение 1 часа. Затем реакционную смесь концентрировали досуха путем роторного испарения. Добавляли THF (12 мл) и H<sub>2</sub>O (12 мл). Смесь перемешивали при 80 °С в течение 7 ч. Анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (200 мл) и водой (100 мл). Твердый карбонат натрия добавляли к водной фазе до осаждения большого количества твердого вещества из водной фазы. Твердое вещество собирали фильтрованием и промывали водой. Осадок на фильтре сушили с использованием масляного насоса с получением целевого соединения 5 (9 г).



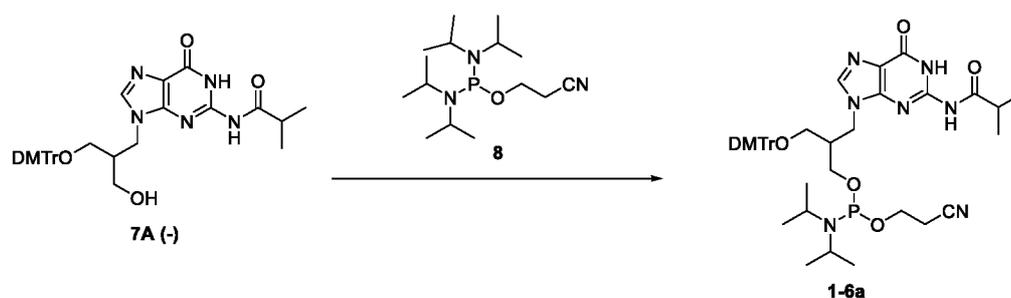
Соединение 5 (6,8 г, 18,581 ммоль) растворяли в пиридине (80 мл) в атмосфере азота. TMSCl (триметилхлорсилан) (14,250 мл, 111,489 ммоль) медленно добавляли при 0 °С. Смесь перемешивали в течение 2 ч. Затем добавляли изобутирилхлорид (2,044 мл, 19,511 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 часа, и анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (200 мл) и водой (200 мл). После того, как органическую фазу высушили и концентрировали досуха путем ротационного испарения, получали образец для очистки. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование DCM:MeOH = 10:1, пик при 4,8%) с получением соединения 6 в виде желтого масла (12 г).



Соединение 6 (5,5 г, 12,392 ммоль) растворяли в пиридине (30 мл) в атмосфере азота. Добавляли молекулярное сито 4А 1/16 (7 г, 12,392 ммоль), а затем добавляли твердый DMTrCl (5,04 г, 14,870 ммоль) партиями при 0 °С. Смесь оставляли реагировать при 25 °С в течение 2 ч, и анализ TLC (тонкослойная хроматография) (PE:EtOAc = 1:1, R<sub>f</sub> = 0,69) показали, что реакция была завершена. Реакционную смесь и TJN200879-040-P1 объединяли и обрабатывали вместе. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (200 мл) и водой (200 мл). После того, как органическую фазу высушили и концентрировали досуха путем ротационного испарения, получали образец для очистки. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование PE:EtOAc, пик при 84%) с получением соединения 7 в виде желтого масла (12 г).

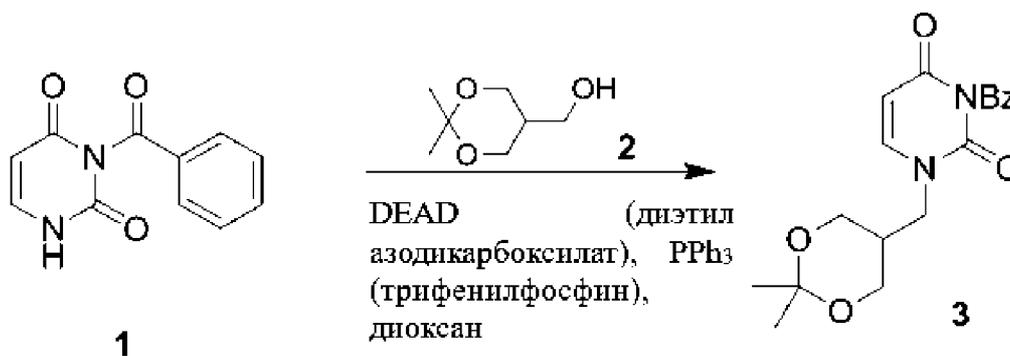


Соединение 7 (12 г, 15,389 ммоль) растворяли в EtOAc (140 мл). Добавляли влажный палладий на углеводе Pd/C (7 г, 15,389 ммоль). Реакционную смесь оставляли реагировать при 25 °С в атмосфере водорода (15 Psi (фунт на квадратный дюйм)) в течение 2 ч. Анализ TLC (PE:EtOAc = 0:1, R<sub>f</sub> = 0,09) показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь фильтровали. После того, как осадок на фильтре трижды промывали этилацетатом (30 мл), фильтрат собирали. После того, как фильтрат концентрировали досуха путем ротационного испарения, добавляли 50 мл дихлорметана и 2 мл триэтиламина для получения образца для очистки. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование DCM:MeOH = 10:1, пик при 0,5%) с получением 9 г (желтое пенистое твердое вещество). Полученное рацемическое соединение расщепляли с помощью SFC с получением продуктов, целевого соединения 7A(-) (3,9 г) и целевого соединения 7B(+). (3,8 г).



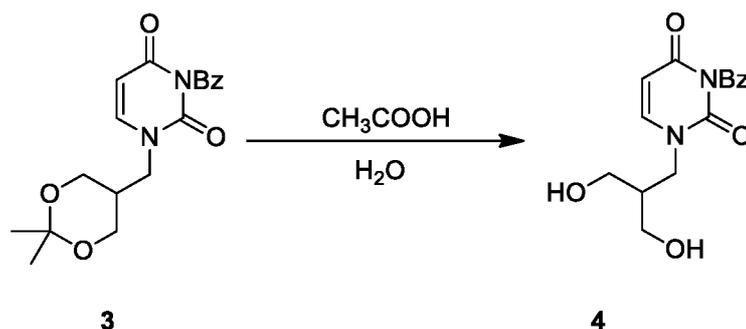
Соединение 7A(-) (3,30 г, 5,40 ммоль), тетразол (190 мг, 2,70 ммоль), 1-метилимидазол (90 мг, 1,10 ммоль) и молекулярное сито 3А (500 мг) растворяли в 30 мл ацетонитрила. Соединение 8 (2,50 г, 8,10 ммоль) добавляли при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли DCM (150 мл). Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (30 мл 3 раза), а затем насыщенным раствором (30 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC (C<sup>18</sup>, условия: 5-100% (А: вода, В: CH<sub>3</sub>CN), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 1-6а (2,9 г, 66%). MS m/z: C<sub>43</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P [M+H]<sup>+</sup>, рассчитано: 812,38, обнаружено: 812,5. <sup>1</sup>H NMR (400 МГц, ацетонитрил-d<sub>3</sub>) δ 7,56, 7,54 (2s, 1H), 7,36-7,27 (m, 2H), 7,24-7,21 (m, 7H), 6,83-6,80 (m, 4H), 4,12-4,10 (m, 2H), 3,75-3,68 (m, 10H), 3,20-2,80 (m, 2H), 2,68-2,54 (m, 4H), 1,22-1,04 (m, 18H).

### 1.3. Синтез соединения 1-7а

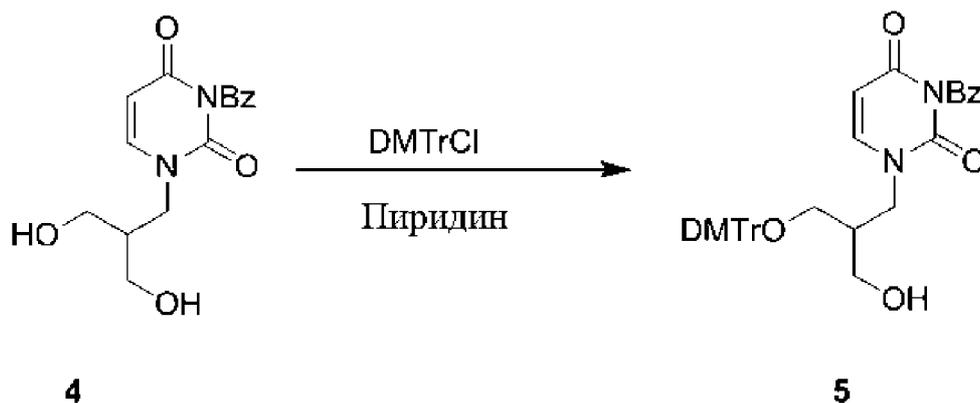


Соединение 1 (5 г, 23,1272 ммоль), соединение 2 (6,76 г, 46,254 ммоль) и трифенилфосфин (7,28 г, 27,753 ммоль) растворяли в 30 мл диоксана в атмосфере азота. DEAD (5,502 мл, 27,753 ммоль) медленно добавляли по каплям при 0 °С. После добавления по каплям реакционную смесь медленно нагревали до 25 °С и оставляли реагировать в течение еще одного часа. К реакционной смеси для экстракции добавляли 100 мл H<sub>2</sub>O и 100 мл EtOAc. После того, как органические фазы объединяли, сушили, фильтровали и концентрировали, получали образец для очистки. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование PE:EtOAc = 1:1) с получением целевого

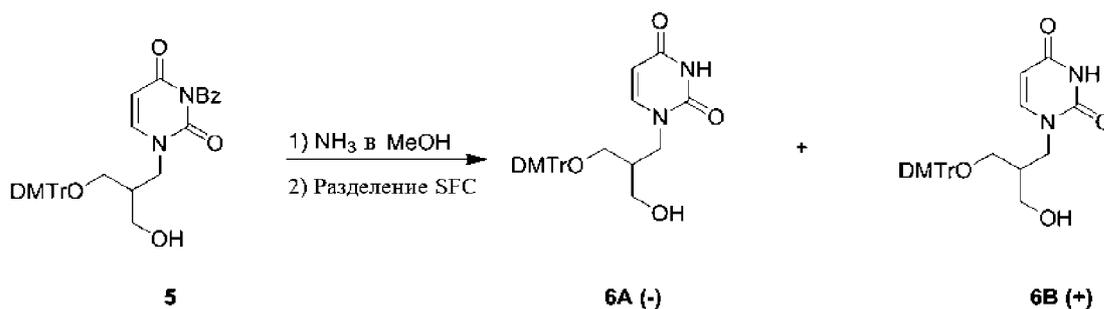
продукта (4 г).



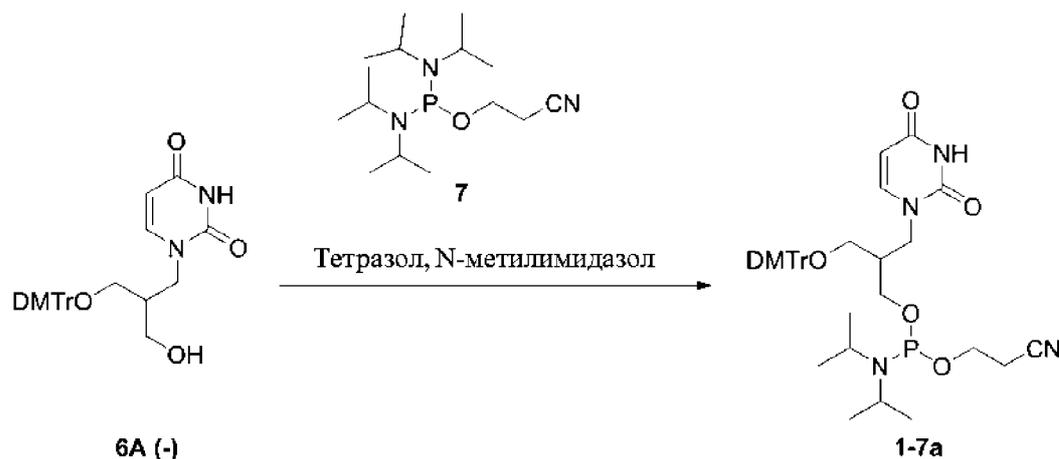
Соединение 3 (3,3 г) растворяли в HOAc (уксусная кислота) (16 мл) и H<sub>2</sub>O (4 мл) и раствор нагревали на масляной бане при 60 °С в течение 0,5 ч. Реакционную смесь концентрировали досуха путем ротационного испарения и полученный остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование PE:EtOAc = 0:1) с получением целевого продукта 4 (3 г).



Соединение 4 (3 г, 8,873 ммоль) растворяли в 5 мл пиридина. Раствор DMTrCl (3,91 г, 11,535 ммоль) в 10 мл пиридина медленно добавляли по каплям при 0 °С в атмосфере азота. После добавления по каплям реакцию смесь нагревали до 25 °С и оставляли реагировать в течение еще одного часа. К реакционной смеси для экстракции добавляли 50 мл воды и 100 мл этилацетата. Водную фазу экстрагировали три раза 100 мл этилацетата. Органические фазы объединяли, сушили, фильтровали и концентрировали, а остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (с PE:EtOAc = 2:1) для получения целевого продукта 5 (4 г).

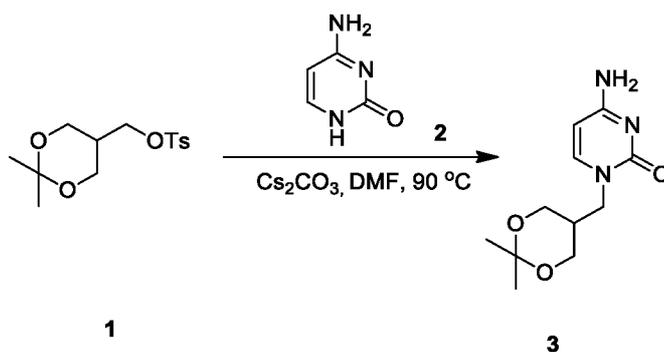


Соединение 5 (4 г, 5,769 ммоль) растворяли в метаноле (10 мл). Добавляли насыщенный раствор  $\text{NH}_3$  в метаноле (40 мл). Смесь оставляли реагировать при 0 °С в течение 6 ч. Реакционную смесь концентрировали досуха путем ротационного испарения и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 0:1) с получением рацемического соединения (2,4 г). Рацемическое соединение разделяли с помощью SFC с получением целевого продукта 6A (750 мг, 100% чистота) и целевого продукта 6B (400 мг, 99,16% чистота).



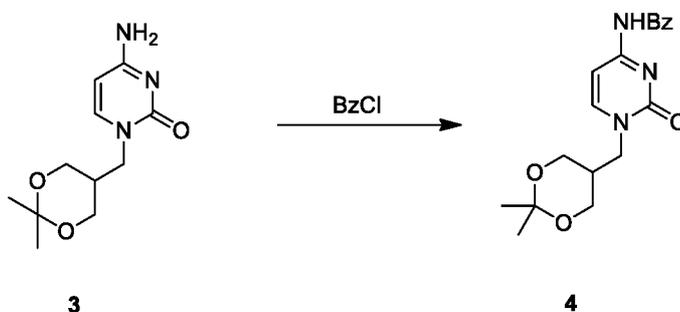
Соединение 6A(-) (700 мг, 1,40 ммоль), тетразол (50 мг, 0,70 ммоль), 1-метилимидазол (23 мг, 0,28 ммоль) и молекулярное сито 3A (500 мг) растворяли в 10 мл ацетонитрила. Соединение 7 (630 мг, 2,10 ммоль) добавляли при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли DCM (50 мл). Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл 3 раза), а затем насыщенным рассолом (20 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC ( $\text{C}^{18}$ , условия: 5-100% (A: вода, B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 1-7a (700 мг, 72%). MS m/z:  $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_7\text{PNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , рассчитано: 725,32, обнаружено: 725,5.

#### 1.4. Синтез соединения 1-8a

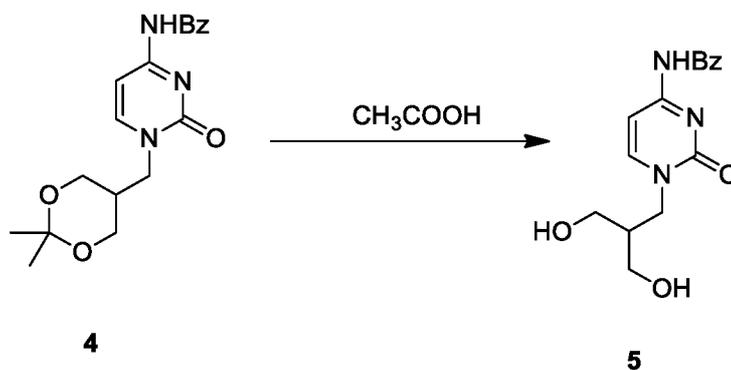


Соединение 1 (8,5 г, 76,508 ммоль) и соединение 2 (30,64 г, 91,809 ммоль) растворяли

в DMF (150 мл). Добавляли  $\text{CS}_2\text{CO}_3$  (29,91 г, 91,809 ммоль). Смесь оставляли реагировать в атмосфере азота при 90 °С в течение 12 ч. Анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали досуха с помощью роторного испарения с использованием масляного насоса, и остаток отделяли и очищали с использованием колонки с нормальной фазой (80 г, DCM/MeOH = от 10/1 до 5/1) для получения целевого продукта 3 (13,5 г, 80% чистоты).



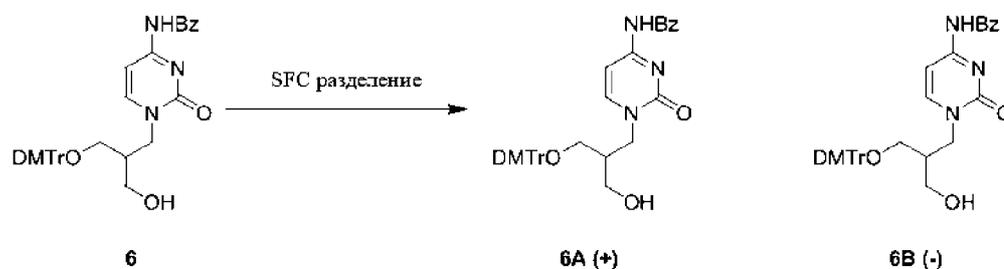
Соединение 3 (10,5 г, 35,105 ммоль) растворяли в пиридине (65 мл) и  $\text{CH}_3\text{CN}$  (65 мл). К раствору по каплям добавляли  $\text{BzCl}$  (4,894 мл, 42,126 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 25 °С в течение 2 часов. Анализ LCMS показал, что большая часть исходного материала была израсходована. Реакционную смесь гасили  $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл) и экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (100 мл 3 раза). Органическую фазу высушивали и концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток отделяли (в сочетании с TJN200872-101) и очищали с помощью колоночной хроматографии (80 г, PE/ $\text{EtOAc}$  = 10/1-0/1, DCM/MeOH = 10/1) с получением целевого продукта 4 (14 г, 90% чистоты).



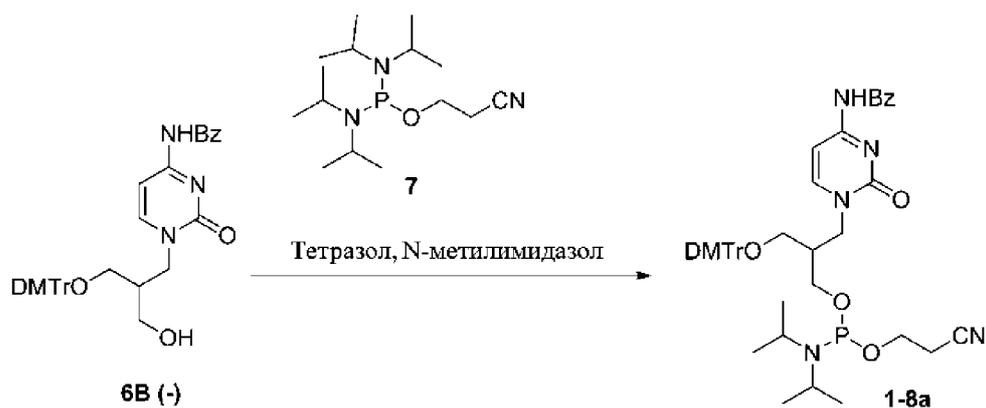
Соединение 4 (14 г, 36,694 ммоль) растворяли в  $\text{HOAc}$  (56 мл, 314,796 ммоль) и  $\text{H}_2\text{O}$  (14 мл). Смесь оставляли реагировать при 60 °С в течение 2 часов, и анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь концентрировали с использованием масляного насоса, а остаток отделяли с использованием колонки с нормальной фазой (40 г, DCM/MeOH = от 1/0 до 5/1) для получения целевого продукта 5 (8,4 г, 90% чистоты и 2,4 г, 80% чистоты).



Соединение 5 (7,4 г, 21,957 ммоль), DMAP (0,54 г, 4,391 ммоль) и молекулярное сито 4А (11,1 г, 2,967 ммоль) растворяли в пиридине (60 мл). Смесь перемешивали на ледяной бане в течение 10 мин, а затем добавляли DMTrCl (8,93 г, 26,348 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1,8 ч, и анализ LCMS показал, что осталось около 19% исходного материала и около 60% было целевым MS. Реакционную смесь и TJN200872-105 и 106 объединяли и очищали вместе. К реакционной смеси добавляли H<sub>2</sub>O (50 мл) и проводили экстракцию DCM (50 мл × 3). Органическую фазу сушили и концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток разделяли с помощью колоночной хроматографии (120 г, PE/(EA:DCM:TEA:TEA = 1:1:0,05) = от 1/0 до 0/1 до DCM/MeOH = 10/1) с получением соединения 6 в виде желтого твердого вещества (11 г, 89% чистоты, TJN200872-105, 106 и 107). Исходный материал извлекали (3,0 г, 70% чистоты).



Соединение 6 (15 г, 22,041 ммоль) расщепляли с помощью SFC (DAICEL CHIRALPAK AD (250 мм × 50 мм, 10 мкм); 0,1% NH<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O EtOH, В: 45%-45%; 200 мл/мин) с получением целевого продукта 6А (5,33 г, 94,29% чистоты) и целевого продукта 6В (6,14 г, 97,91% чистоты). Выделяли 1,0 г соединения 6.



Соединение 6B(-) (5,4 г, 8,92 ммоль), тетразол (312 мг, 4,46 ммоль), 1-метилимидазол (146 мг, 1,78 ммоль) и молекулярное сито 3A (500 мг) растворяли в 40 мл ацетонитрила. Соединение 7 (4 г, 13,4 ммоль) добавляли при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли DCM (200 мл). Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (30 мл 3 раза), а затем насыщенным раствором (50 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем ротационного испарения, а остаток очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC (C<sup>18</sup>, условия: 5-100% (А: вода, В: CH<sub>3</sub>CN), скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали с получением соединения 1-8a (5,8 г, 80%). MS m/z: C<sub>45</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P, [M+H]<sup>+</sup>, рассчитано: 804,36, обнаружено: 804,4.

## Пример 2. Синтез миРНК

Синтез миРНК был таким же, как и обычный твердофазный синтез фосфорамидита. При синтезе модифицированного нуклеотида в положении 7 5'-конца AS-цепи исходный нуклеотид исходной последовательности заменяли синтезированным выше фосфорамидитным мономером. Процесс синтеза кратко описан ниже: Нуклеозидные фосфорамидитные мономеры связывали один за другим в соответствии с программой синтеза на синтезаторе Dr. Oligo48 (Biolytic), начиная с универсальной подложки CPG (стекло с контролируемой пористостью). За исключением мономера фосфорамидита в положении 7 5'-конца AS-цепи, описанной выше, другие нуклеозидные мономерные материалы 2'-F РНК, 2'-О-метил РНК и другие нуклеозидные фосфорамидитные мономеры были приобретены у HONGENE, Shanghai или Genepharma, Suzhou. 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ) использовали в качестве активатора (0,6 М раствор в ацетонитриле), 0,22 М раствор PADS в ацетонитриле и коллидине (1:1 по объему) (Kroma, Suzhou) в качестве сульфорирующего агента и раствор йодопиридин/вода (Kroma) в качестве окислителя.

После завершения твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и замачивали в растворе 28% аммиачной воды и этанола (3:1) при 50 °С

в течение 16 ч. Смесь центрифугировали, и супернатант переносили в другую центрифужную пробирку. После того, как супернатант концентрировали досуха путем выпаривания, остаток очищали с помощью  $C^{18}$  обращенно-фазовой хроматографии с использованием 0,1 М ТЕАА (ацетат триэтиламмония) и ацетонитрила в качестве подвижной фазы, и ДМТг удаляли с использованием 3% раствора трифторуксусной кислоты. Целевые олигонуклеотиды собирали, затем лиофилизировали, идентифицировали в качестве целевых продуктов с помощью LC-MS и количественно определяли с помощью УФ-детекции (260 нм).

Полученные одноцепочечные олигонуклеотиды спаривали в равновесном соотношении комплементарным образом и отжигали. Конечную двухцепочечную миРНК растворяли в 1×PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), и раствор доводили до концентрации, необходимой для эксперимента, чтобы он был готов к использованию.

### Пример 3. Скрининг активности psiCHECK

Синтез образцов миРНК является таким, как описано выше. Плазмиды получали от Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd. Экспериментальные расходные материалы для psiCHECK приведены в таблице 1.

Таблица 1 Экспериментальные расходные материалы и реагенты для psiCHECK

Расходные реагенты				
Наименование	Компания	Номер по каталогу/модель	Серия №	Срок годности
Клетки huh 7	Cobioer, Nanjing	ATCC-Cobioer/CBP60202	/	/
Система анализа люциферазы Dual-Glo®	Promega	E2940	0000363099	2020/5/13
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	11668-019	/	2021/6/14

Процедура эксперимента: Осуществляли посев клеток и трансфекцию клеток. Конкретные количества для получения трансфекционного комплекса приведены в таблице 2.

Таблица 2. Количество, необходимое для трансфекционного комплекса в каждой лунке 96-луночного планшета

	Количество/лунку	Opti-MEM
--	------------------	----------

Смесь плазмид	0,05 мкл	10 мкл
Lipofectamine 2000	0,2 мкл	10 мкл

Примечание: Lipo: 0,2 мкл/лунку; Плазмида: 0,05 мкл/лунку; Opti-MEM: 10 мкл/лунку.

В соответствии с таблицей 3, разведения с различными концентрациями получали в качестве рабочих растворов для немедленного использования на основе различных экспериментальных требований. Через 24 ч после трансфекции анализы проводили в соответствии с инструкциями набора для системы анализа люциферазы Dual-Glo®.

Расчет относительного значения:  $\text{Соотношение} = \frac{\text{Ren}}{\text{Fir}}$  (соотношение ренилла/светлячок);

Расчет скорости ингибирования:  $1 - (\text{соотношение} + \text{миРНК} / \text{только репортерный ген}) \times 100\% = \text{скорость ингибирования} (\%)$ ;

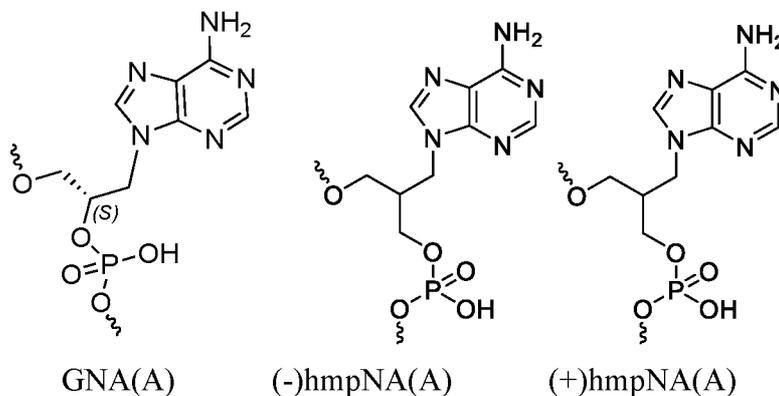
В настоящем изобретении остаточная активность% (также называемая остаточным уровнем экспрессии мРНК, %, или остаточным соотношением экспрессии мРНК) =  $100\% - \text{скорость ингибирования} (\%)$ .

Таблица 3. Протокол разведения нескольких концентраций

Конечная концентрация (нМ)	Добавление воды и образца
/	/
40	4 мкл миРНК (20 мкМ) + 96 мкл H <sub>2</sub> O
13,33333333	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
4,444444444	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
1,481481481	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,49382716	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,164609053	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,054869684	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,018289895	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,006096632	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,002032211	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O
0,000677404	30 мкл миРНК + 60 мкл H <sub>2</sub> O

Пример 4 Эксперименты с целевой и нецелевой активностью миРНК, состоящие из различных химических модификаций

МиРНК синтезировали с использованием соединений Примера 1 и способа Примера 2, а целевую активность и нецелевую активность каждой миРНК проверяли с использованием способа Примера 3. МиРНК имели идентичные смысловые цепи и содержали следующие модифицированные нуклеотиды/химические модификации, соответственно, в положении 7 5'-конца антисмысловой цепи:



где нуклеотид, синтезированный с использованием 2-гидроксиметил-1,3-пропандиола в качестве исходного материала, был определен как hmpNA;

(+)hmpNA(A) получали твердофазным синтезом с использованием нуклеозидного фосфорамидитного мономера 1-1b из приведенного в качестве примера раздела 1.1, и его абсолютная конфигурация составляла (S)-hmpNA(A);

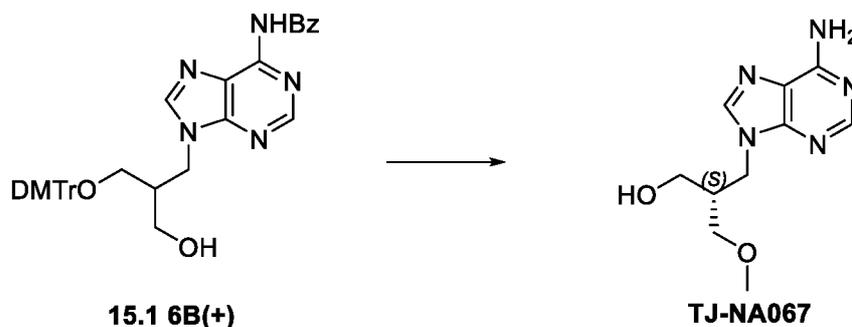
(-)hmpNA(A) получали твердофазным синтезом с использованием нуклеозидного фосфорамидитного мономера 1-1a из приведенного в качестве примера раздела 1.1, и его абсолютная конфигурация составляла (R)-hmpNA(A).

Аналогично, были получены следующие структуры путем твердофазного синтеза и путем изменения основных видов hmpNA, и были определены их абсолютные конфигурации:

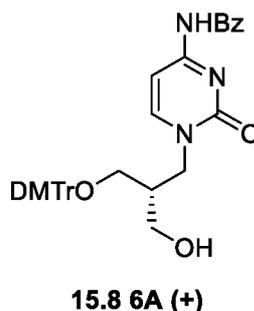
- (+)hmpNA(G), с абсолютной конфигурацией (S)-hmpNA(G);
- (-)hmpNA(G), с абсолютной конфигурацией (R)-hmpNA(G);
- (+)hmpNA(C), с абсолютной конфигурацией (S)-hmpNA(C);
- (-)hmpNA(C), с абсолютной конфигурацией (R)-hmpNA(C);
- (+)hmpNA(U), с абсолютной конфигурацией (R)-hmpNA(U); и
- (-)hmpNA(U), с абсолютной конфигурацией (S)-hmpNA(U).

Абсолютные конфигурации (S)-hmpNA(G), (R)-hmpNA(G), (S)-hmpNA(C), (R)-hmpNA(C), (S)-hmpNA(U) и (R)-hmpNA(U) определяли по их промежуточным соединениям или производным с помощью рентгеновской дифракции.

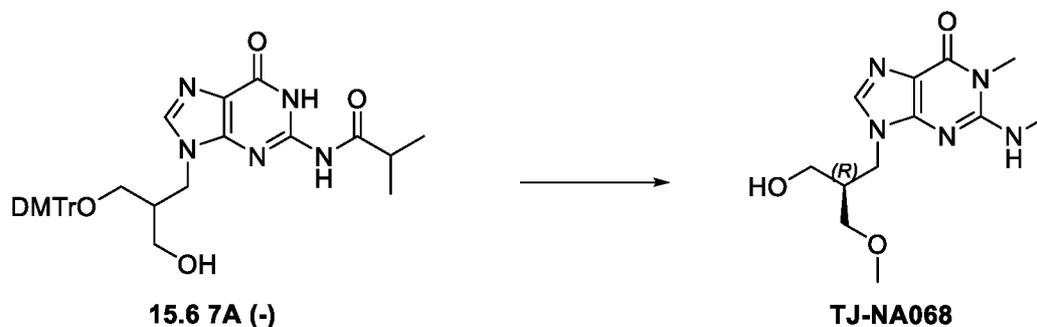
Структуры промежуточных соединений или производных представляют собой:



TJ-NA067: определяли как бесцветный массивный кристалл ( $0,30 \times 0,10 \times 0,04$  мм<sup>3</sup>), принадлежащий к моноклинной кристаллической системе с пространственной группой P21. Параметр решетки  $a = 16,0496(5)$  Å,  $b = 4,86260(10)$  Å,  $c = 16,4686(5)$  Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 118,015(4)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 1134,65(7)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ . Расчетная плотность  $D_c = 1,389$  г/см<sup>3</sup>; количество электронов в элементарной ячейке  $F(000) = 504,0$ ; коэффициент линейного поглощения элементарной ячейки  $\mu$  (Cu K $\alpha$ ) = 0,840 мм<sup>-1</sup>; температура дифракционного эксперимента  $T = 150,00(11)$  К.

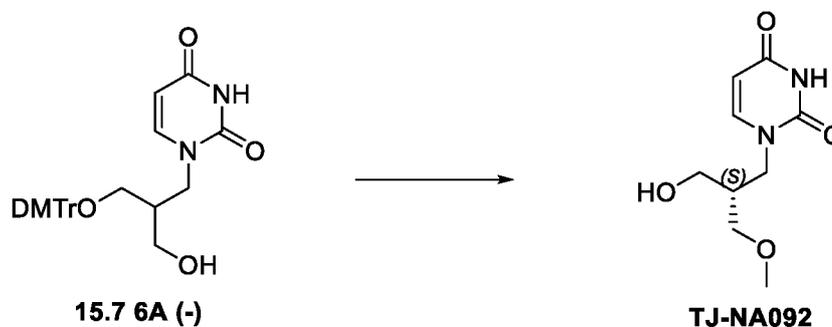


6A(+): определяется как бесцветный массивный кристалл ( $0,30 \times 0,20 \times 0,10$  мм<sup>3</sup>), принадлежащий к моноклинной кристаллической системе с пространственной группой P21. Параметр решетки  $a = 22,6688(7)$  Å,  $b = 8,5595(2)$  Å,  $c = 23,3578(5)$  Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 113,876(3)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 4144,3(2)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ . Расчетная плотность  $D_c = 0,999$  г/см<sup>3</sup>; количество электронов в элементарной ячейке  $F(000) = 1318,0$ ; коэффициент линейного поглощения элементарной ячейки  $\mu$  (Cu K $\alpha$ ) = 0,570 мм<sup>-1</sup>; температура дифракционного эксперимента  $T = 100,01(18)$  К.



TJ-NA048: определяется как бесцветный игольчатый кристалл ( $0,30 \times 0,04 \times 0,04$  мм<sup>3</sup>), принадлежащий к моноклинной кристаллической системе с пространственной

группой P1. Параметр решетки  $a = 7,6165(4) \text{ \AA}$ ,  $b = 11,3423(5) \text{ \AA}$ ,  $c = 17,3991(8) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 85,007(4)^\circ$ ,  $\beta = 88,052(4)^\circ$ ,  $\gamma = 70,532(4)^\circ$ ,  $V = 1411,75(12) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 2$ . Расчетная плотность  $D_c = 1,366 \text{ г/см}^3$ ; количество электронов в элементарной ячейке  $F(000) = 620,0$ ; коэффициент линейного поглощения элементарной ячейки  $\mu (\text{Cu K}\alpha) = 0,856 \text{ мм}^{-1}$ ; температура дифракционного эксперимента  $T = 150,00(13) \text{ К}$ .



TJ-NA092: определяется как бесцветный призматический кристалл ( $0,30 \times 0,10 \times 0,10 \text{ мм}^3$ ), принадлежащий к триклинической кристаллической системе с пространственной группой P1. Параметр решетки  $a = 5,17960(10) \text{ \AA}$ ,  $b = 8,0667(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 12,4077(2) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 93,146(2)^\circ$ ,  $\beta = 101,266(2)^\circ$ ,  $\gamma = 96,134(2)^\circ$ ,  $V = 503,993(18) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 2$ . Расчетная плотность  $D_c = 1,412 \text{ г/см}^3$ ; количество электронов в элементарной ячейке  $F(000) = 228,0$ ; коэффициент линейного поглощения элементарной ячейки  $\mu (\text{Cu K}\alpha) = 0,945 \text{ мм}^{-1}$ ; температура дифракционного эксперимента  $T = 100,00(10) \text{ К}$ .

Пример 5. Эксперимент по зависимости от последовательности миРНК, содержащих различные химические модификации

Экспериментальные соединения по настоящему изобретению тестировали на нескольких различных последовательностях. Использовали миРНК, нацеленные на мРНК разных генов, и модифицировали положение 7 5'-конца цепей AS с использованием (+)hmpNA(A), (-)hmpNA(A) и соединения GNA(A), которое использовали в качестве контроля (последовательности показаны в таблице 4-1 и таблице 4-2).

Таблица 4-1. Смысловые цепи миРНК, нацеленные на различные гены

Ген-мишень миРНК	SS цепь 5'-3'
ANGPTL3	GmsAmsAmCmUfAmCfUfCfCmCmUmUmUmCmUmUmCmAm (SEQ ID NO:431)
HBV-S	CmsCmsAmUmUfUmGfUfUfCmAmGmUmG

	mGmUmUmCmsGm (SEQ ID NO:432)
HBV-X	CmsAmsCmCmUfCmUfGfCfAmCmGmUmCm GmCmAmUmsGm (SEQ ID NO:433)

Таблица 4-2. Антисмысловые цепи мРНК, нацеленные на различные гены и содержащие химические модификации

мРНК-мишень	№ двухцепочечной мРНК	Модификация цепи AS (SEQ ID NO:)
ANGPTL3	TRD5841	UmsGfsAmAfGmAfGNA(A)AmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm (SEQ ID NO:369)
	TRD5845	UmsGfsAmAfGmAf(+)hmpNA(A)AmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm (SEQ ID NO:370)
	TRD5846	UmsGfsAmAfGmAf(-)hmpNA(A)AmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm (SEQ ID NO:371)
HBV-S	TRD5848	UmsGfsAmAmCmCfGNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmUfUmGmGmsCmsAm (SEQ ID NO:372)
	TRD5852	UmsGfsAmAmCmCf(+)hmpNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm (SEQ ID NO:373)
	TRD5853	UmsGfsAmAmCmCf(-)hmpNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm (SEQ ID NO:374)
HBV-X	TRD5855	UmsAfsUmGfCmGfGNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm (SEQ ID NO:375)
	TRD5859	UmsAfsUmGfCmGf(+)hmpNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm (SEQ ID NO:376)
	TRD5860	UmsAfsUmGfCmGf(-)hmpNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm (SEQ ID NO:377)

Результаты эксперимента с целевой активностью приведены в таблице 5. GNA(A) показала значительную зависимость от последовательности, а различные последовательности имели значительно различающуюся целевую активность. Экспериментальные соединения по настоящему изобретению не показали значительной

зависимости от последовательности, что указывает на то, что они более универсально применимы.

Таблица 5. Результаты целевой активности миРНК для различных последовательностей-мишеней

Код двойной цепи	Оставшийся процент экспрессии (среднее значение) мРНК гена-мишени (целевая активность)											Значение IC <sub>50</sub> (нМ)
	40 нМ	13,3 нМ	4,44 нМ	1,48 нМ	0,49 нМ	0,16 нМ	0,05 нМ	0,01 нМ	0,00 нМ	0,00 нМ	0,00 нМ	
TRD 5841	57,5%	51,1%	55,5%	68,3%	76,5%	85,9%	82,9%	87,8%	81,5%	64,0%	97,8%	>40
TRD 5845	28,2%	30,5%	41,7%	55,0%	63,9%	78,0%	77,1%	84,1%	95,8%	83,2%	91,9%	1,9953
TRD 5846	31,6%	26,8%	34,1%	59,1%	84,8%	102,1%	97,2%	108,9%	95,6%	107,2%	102,1%	1,9055
TRD 5848	46,5%	35,1%	26,6%	36,0%	67,3%	76,3%	88,4%	104,1%	91,6%	95,1%	98,1%	0,7943
TRD 5852	24,7%	17,5%	13,1%	21,1%	40,5%	64,1%	84,3%	94,5%	88,4%	100,2%	95,1%	0,2951
TRD 5853	17,5%	11,5%	9,9%	13,5%	30,3%	54,5%	74,6%	86,3%	90,3%	91,0%	84,1%	0,1905
TRD 5855	41,3%	40,7%	36,9%	73,6%	71,7%	87,0%	89,0%	85,8%	94,9%	104,4%	101,6%	4,2658
TRD 5860	43,5%	37,1%	34,1%	50,8%	77,6%	88,5%	86,6%	100,0%	95,1%	97,8%	110,8%	1,5488

IC<sub>50</sub> - концентрация полумаксимального ингибирования

Результаты эксперимента нецелевой активности приведены в таблице 6. Можно видеть, что экспериментальные соединения по настоящему изобретению значительно снижают нецелевую активность миРНК по сравнению с исходными последовательностями.

Таблица 6. Результаты нецелевой активности миРНК для различных последовательностей-мишеней

Код	Оставшийся процент экспрессии (среднее значение) мРНК гена-мишени
-----	-------------------------------------------------------------------

двойной цепи	(нецелевая активность)										
	40 нМ	13,3 нМ	4,44 нМ	1,48 нМ	0,493 нМ	0,164 нМ	0,054 нМ	0,018 нМ	0,0060 нМ	0,0020 нМ	0,00 нМ
TRD 5855	71,1%	78,2%	81,6%	92,0%	91,0%	94,1%	87,3%	93,6%	99,4%	119,9%	96,6%
TRD 5859	79,8%	81,0%	86,0%	96,4%	101,9%	98,8%	99,8%	118,4%	101,3%	93,3%	103,2%
TRD 5860	78,4%	75,6%	80,6%	86,1%	83,2%	95,9%	91,6%	91,5%	95,6%	97,3%	98,6%

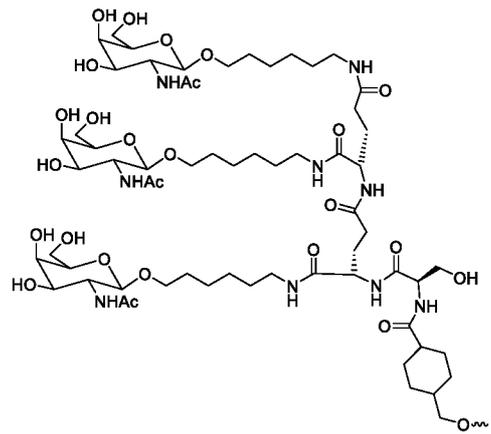
#### Пример 6. Оценка различных модификаций в положениях 9 и 10 цепей AS

В этом эксперименте исследовали эффективность конъюгатов миРНК или дцРНК с 2'-фтор-модификациями в разных сайтах по настоящему изобретению в ингибировании уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo*.

Самцов мышей C57BL/6 в возрасте от 6 до 8 недель рандомизировали в группы по 6, 3 мыши на временную точку, и каждой группе мышей вводили тестовые конъюгаты (2 конъюгата, TRD007047 и TRD006870), контрольный конъюгат (TRD002218) и PBS. Всем животным вводили однократную дозу путем подкожной инъекции в зависимости от их массы тела. Конъюгаты миРНК или дцРНК вводили в дозе 1 мг/кг (рассчитанной на основе миРНК) в объеме 5 мл/кг. Мышей умерщвляли через 7 дней после введения, а их печень собирали и позднее консервировали с РНК (Sigma Aldrich). Затем ткань печени гомогенизировали с использованием тканевого гомогенизатора, а общую РНК экстрагировали из ткани печени с использованием набора для экстракции тканевой РНК (FireGen Biomedicals, FG0412), следуя процедуре, описанной в инструкциях. Общая РНК была обратно транскрибирована в кДНК, а уровень экспрессии мРНК TTR в ткани печени измеряли с помощью количественной PCR с флуоресценцией в реальном времени. В методе количественной PCR с флуоресценцией в качестве внутреннего эталонного гена использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), а уровни экспрессии мРНК TTR и GAPDH измеряли с использованием праймеров-зондов Taqman для TTR и GAPDH, соответственно. Соединения показаны в таблице 7, группы соединений для эксперимента *in vivo* на мышах показаны в таблице 8, а праймеры показаны в таблице 9.

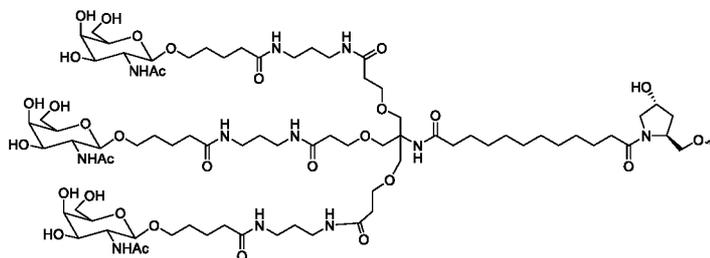
Таблица 7. Изменение положения 9 и положения 10 цепей AS

	Цепь SS (SEQ ID NO:)	Цепь AS (SEQ ID NO:)
TRD002218	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmA mAm-L96 (SEQ ID NO:378)	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmA mAmGmAmAfCmAfCmUmGmsU msUm (SEQ ID NO:381)
TRD007047	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmA msAms-NAG1(SEQ ID NO:379)	UmsUfsAmUfAmGf(- ) <u>hmpNA(A)</u> GmCfAmAmGfAmAf CmAfCmUfGmsUmsUm SEQ ID NO:382)
TRD006870	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmA msAms-NAG1(SEQ ID NO:380)	UmsUfsAmUfAmGf(- ) <u>hmpNA(A)</u> GmCmAfAmGfAmAf CmAfCmUfGmsUmsUm (SEQ ID NO:383)



Структура NAG1 представляет собой:

Соединение NAG1 получали согласно способу, описанному в патенте WO2021254360A1;



структура L96:

Контрольное соединение L96 получали с использованием способа, описанного в патенте WO2014025805A1.

Таблица 8. Группы для эксперимента *in vivo* на мышах

№	дозы	Количественное определение мРНК	Количество животных	Примечание
PBS	-	D7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD002218	1 мг/кг подкожно	D7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD007047	1 мг/кг подкожно	D7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD006870	1 мг/кг подкожно	D7, 28	6	3 мыши на временную точку

Таблица 9. Последовательности праймеров обнаружения

Наименование праймера	Прямой праймер
mTTR-F	GGGAAGACCGCGGAGTCT (SEQ ID NO:384)
mTTR-R	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA (SEQ ID NO:385)
mTTR-P	5`6-FAM-CTGCACGGGCTCACCACAGATGA- 3`BHQ1 (SEQ ID NO:386)
mGAPDH-F	CGGCAAATTCAACGGCACAG (SEQ ID NO:387)
mGAPDH-R	CCACGACATACTCAGCACCG (SEQ ID NO:388)
mGAPDH-P	5`TET-ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT- 3`BHQ2 (SEQ ID NO:389)

Эффективность конъюгатов миРНК или дцРНК с фтор-модификациями в разных сайтах по настоящему изобретению в ингибировании уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo* через 28 дней после введения показана в таблице 10. Конъюгаты миРНК с фтор-модификациями в разных сайтах ингибировали большую экспрессию мРНК TTR, чем эталонный положительный контроль TRD002218 через 28 дней после введения. Оба

способа модификации показали высокую эффективность ингибирования, и ингибирующие эффекты существенно не отличались, что указывает на то, что как способы модификации положения 9 цепи AS, так и способы модификации положения 10 могут опосредовать более высокую эффективность ингибирования.

Таблица 10. Результаты 7-дневного и 28-дневного тестов

9/10F	№	7 дней		28 дней	
		Оставшаяся мРНК	SD	Оставшаяся мРНК	SD
	PBS	100%	11%	100%	9%
PC	TRD002218	31%	7%	49%	5%
mTTR 9F	TRD007047	15%	5%	39%	10%
mTTR 10F	TRD006870	13%	4%	36%	3%

Уровень экспрессии мРНК TTR рассчитывали в соответствии с приведенным ниже уравнением:

Уровень экспрессии мРНК TTR = [(уровень экспрессии мРНК TTR тестовой группы/уровень экспрессии мРНК GAPDH тестовой группы)/(уровень экспрессии мРНК TTR контрольной группы/уровень экспрессии мРНК GAPDH контрольной группы)]×100%

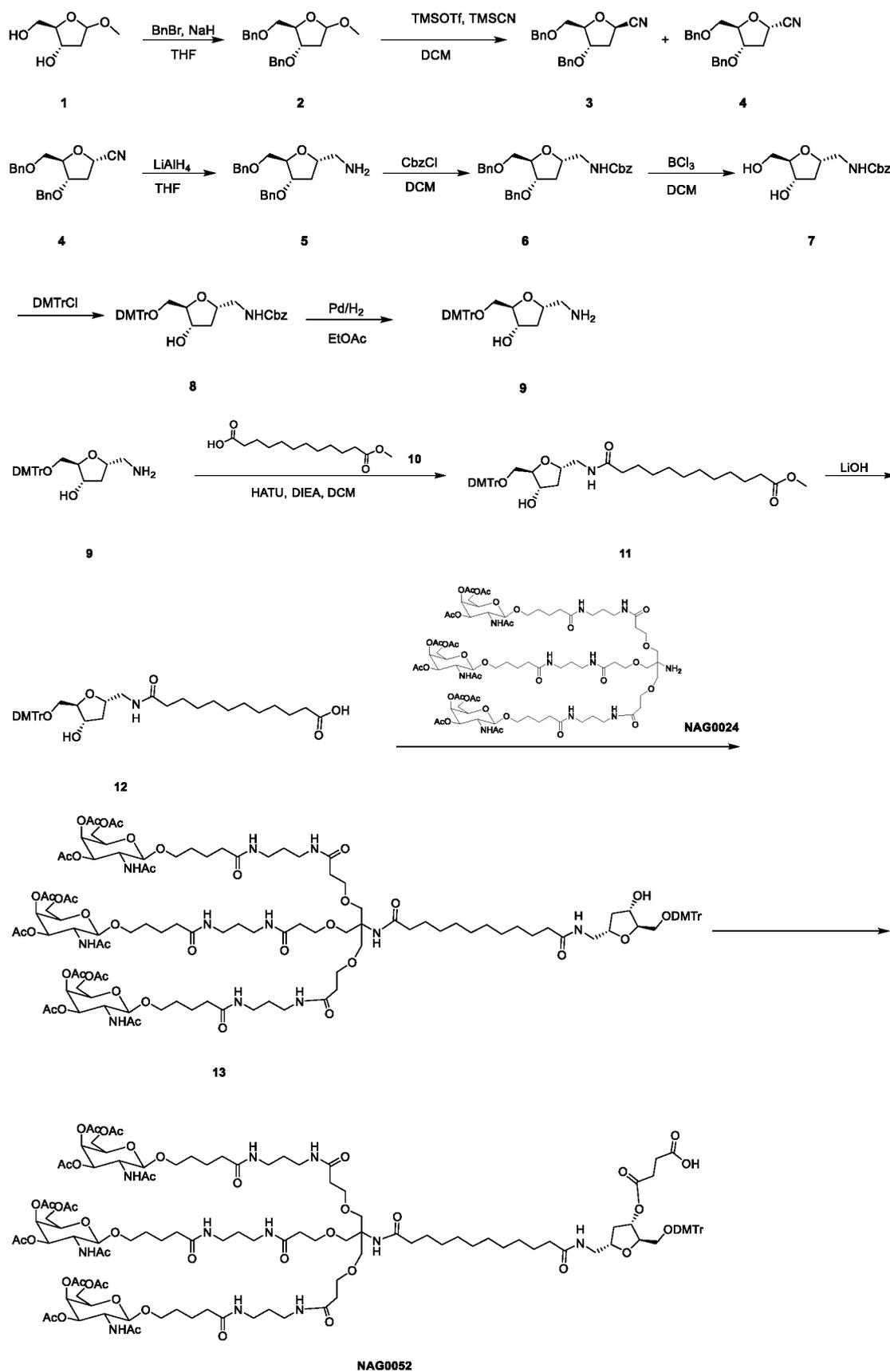
Часть два. Нацеливающие лиганды

Пример 7. Получение NAG0052 и L96

Соединения NAG0024 и NAG0026 были приобретены у WuXi AppTec (Tianjin) Co. Ltd. Если не указано иное, все реагенты, используемые в следующих примерах, являются коммерчески доступными.

(1) Синтез соединения NAG0052

Соединение исходного материала 1 было приобретено у Jiangsu Beida Pharmatech Ltd.



## Соединение 2

NaH (12,2 г, 304 ммоль, чистота 60%) добавляли порциями к раствору соединения 1 (12,3 мл, 101 ммоль) в THF (300 мл) при 0 °С в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 часа, а затем снова охлаждали до 0 °С. Затем по каплям в систему

добавляли бензилбромид (36,3 мл, 304 ммоль) и перемешивали смесь при 20 °С в течение 12 часов. Реакционную смесь гасили H<sub>2</sub>O (100 мл), а затем экстрагировали EtOAc (200 мл × 2). Объединенные органические фазы промывали насыщенным солевым раствором (100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали, и полученный остаток отделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением целевого соединения 2 (20,0 г, 51,8 ммоль, выход 51%).

LCMS:  $t_R = 2,615$  и  $2,820$  мин через 30-90AB\_7 мин\_220 и 254\_Shimadzu.lcm (Xtimate C<sup>18</sup>, 3 мкм, 2,1 × 30 мм), MS (ESI)  $m/z = 351,2$  [M+Na]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR: (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  млн<sup>-1</sup> 7,35-7,12 (m, 10H), 5,06-4,95 (m, 1H), 4,51-4,39 (m, 4H), 4,24-3,87 (m, 2H), 3,50-3,40 (m, 2H), 3,38-3,20 (m, 3H), 2,20-1,91 (m, 2H).

#### Соединение 3 и соединение 4

TMSCN (13,5 мл, 101 ммоль) добавляли за один раз к раствору соединения 2 (13,0 г, 33,6 ммоль) в DCM (300 мл) при 20 °С в атмосфере азота, а затем по каплям добавляли раствор TMSOTf (9,14 мл, 50,5 ммоль) в DCM (30 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 15 ч. После завершения реакции систему гасили насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (80 мл) и экстрагировали DCM (150 мл × 2). Объединенные органические фазы промывали насыщенным солевым раствором (80 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток отделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением целевого соединения 3 (3,30 г, 9,18 ммоль, выход 27%) и соединения 4 (8,50 г, 9,18 ммоль, выход 70%) в виде бледно-желтой маслянистой жидкости.

#### Соединение 3

<sup>1</sup>H NMR: (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  млн<sup>-1</sup> 7,42-7,29 (m, 10H), 4,81 (t, J = 7,8 Гц, 1H), 4,65-4,49 (m, 4H), 4,30-4,21 (m, 2H), 3,65-3,57 (m, 1H), 3,57-3,49 (m, 1H), 2,49-2,40 (m, 2H).

#### Соединение 4

<sup>1</sup>H NMR: (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  млн<sup>-1</sup> 7,42-7,26 (m, 10H), 4,93-4,87 (m, 1H), 4,65-4,48 (m, 4H), 4,43-4,38 (m, 1H), 4,21-4,17 (m, 1H), 3,79-3,70 (m, 1H), 3,54 (d, J = 4,0 Гц, 1H), 2,45-2,37 (m, 2H).

#### Соединение 5

Раствор соединения 4 (3,00 г, 9,28 ммоль) в THF (15 мл) добавляли по каплям к раствору LiAlH<sub>4</sub> (0,79 г, 20,9 ммоль) в THF (15 мл) при 0 °С в атмосфере азота. После добавления по каплям систему оставляли реагировать при 0 °С в течение 1 ч. TLC-мониторинг (PE:EtOAc = 3:1) показал, что исходный материал был полностью израсходован. Декагидрат сульфата натрия медленно добавляли к реакционной смеси до тех пор, пока больше не образовывались пузырьки. Затем реакционную смесь фильтровали и

осадок на фильтре трижды промывали дихлорметаном (60 мл). Фильтрат собирали и концентрировали досуха путем роторного испарения с получением соединения 5 (3,00 г, выход 90%).

$^1\text{H NMR}$ : (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  млн $^{-1}$  7,40-7,14 (m, 10H), 4,54-4,38 (m, 4H), 4,06-3,99 (m, 2H), 3,91 (q,  $J = 6,4$  Гц, 1H), 3,48-3,37 (m, 2H), 2,67-2,52 (m, 2H), 2,21-2,18 (m, 1H), 1,77-1,73 (m, 1H).

#### Соединение 6

Соединение 5 (3,00 г, 8,25 ммоль) растворяли в DCM (30 мл) в атмосфере азота и добавляли TEA (3,44 мл, 24,7 ммоль) и  $\text{CbzCl}$  (1,76 мл, 12,4 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 20 °C в течение 2 часов, и анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь добавляли к дихлорметану (30 мл) и воде (60 мл) для экстракции. Органическую фазу трижды промывали водой (60 мл  $\times$  3), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали, а остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 1:1) с получением целевого соединения 6 (2,5 г, выход 90%).

LCMS:  $t_R = 0,810$  мин в 5-95AB\_1 мин, MS (ESI)  $m/z = 462,2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H NMR}$ : (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  млн $^{-1}$  7,39-7,29 (m, 15H), 5,35 (s, 1H), 5,15-5,01 (m, 2H), 4,72 (d,  $J = 6,0$  Гц, 1H), 4,54-4,40 (m, 3H), 4,26 (s, 1H), 4,23-4,18 (m, 1H), 4,11-4,04 (m, 1H), 3,54-3,41 (m, 3H), 3,37-3,25 (m, 1H), 2,34-2,23 (m, 1H), 1,85-1,79 (m, 1H).

#### Соединение 7

Соединение 6 (2,00 г, 3,90 ммоль) растворяли в DCM (5 мл) в атмосфере азота и добавляли раствор  $\text{BCl}_3$  в THF (1 M, 27,3 мл) при -78 °C. Смесь оставляли реагировать в течение 1 часа. THF-мониторинг (DCM:MeOH = 10:1) показал, что исходный материал был полностью израсходован. Реакционную смесь гасили метанолом (20 мл) при -78 °C и концентрировали, а остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (DCM:MeOH = 10:1) для получения целевого соединения 7 (2,00 г, выход 60%).

$^1\text{H NMR}$ : (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  млн $^{-1}$  7,41-7,23 (m, 5H), 5,08 (s, 2H), 4,25-4,07 (m, 2H), 3,85-3,75 (m, 1H), 3,63-3,56 (m, 1H), 3,54-3,48 (m, 1H), 3,30-3,27 (m, 2H), 2,34-2,21 (m, 1H), 1,71-1,64 (m, 1H).

#### Соединение 8

Соединение 7 (0,50 г, 1,78 ммоль) растворяли в пиридине (5 мл) в атмосфере азота и добавляли 4A молекулярное сито (500 мг) и  $\text{DMTrCl}$  (0,66 мл, 2,13 ммоль) при 0 °C. Затем смесь нагревали до 20 °C и оставляли реагировать в течение 1,5 ч. TLC-мониторинг (PE:EtOAc = 2:1) показал, что исходный материал был полностью израсходован. Реакционную смесь добавляли к этилацетату (60 мл) и воде (60 мл) для экстракции.

Органическую фазу трижды промывали водой (60 мл × 3), затем сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали, а остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 1:1) с получением целевого соединения 8 (800 мг, выход 90%).

$^1\text{H NMR}$ : (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  мл $^{-1}$  7,144 (d,  $J = 7,66$  Гц, 2H), 7,37-7,23 (m, 11H), 7,22-7,15 (m, 1H), 6,84 (d,  $J = 8,8$  Гц, 4H), 5,09 (s, 2H), 4,31-4,17 (m, 2H), 4,02-3,91 (m, 1H), 3,84-3,73 (m, 6H), 3,33 (s, 1H), 3,28 (s, 1H), 3,19-3,01 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 1H), 1,70-1,62 (m, 1H).

#### Соединение 9

Соединение 8 (800 мг, 1,234 ммоль) растворяли в EtOAc (5 мл) и добавляли Pd/C 10% (800 мг, 7,517 ммоль). Смесь оставляли реагировать в атмосфере  $\text{H}_2$  (15 Psi при 20 °C в течение 1 часа. Анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре трижды промывали дихлорметаном (100 мл) и метанолом (100 мл). Фильтрат концентрировали, а остаток отделяли с использованием обращенно-фазовой колонки с получением соединения 9 (300 мг, 54%).

LCMS:  $t_R = 2,586$  мин в 10-80CD\_3 мин MS (ESI)  $m/z = 450,2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Соединение 11

Соединение 10 (435 мг, 1,780 ммоль) растворяли в DCM (10 мл) и добавляли DIEA (0,441 мл, 2,67 ммоль) и NATU (677 мг, 1,78 ммоль). Затем добавляли соединение 9 (400 мг, 0,890 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 20 °C в течение 1 часа. TLC-мониторинг (DCM:MeOH = 10:1) показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь добавляли к дихлорметану (60 мл) и воде (60 мл) для экстракции. Органическую фазу трижды промывали водой (60 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали, а остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование с PE:EtOAc = 0:1, пик продукта при 100%) с получением целевого соединения 11 (600 мг, выход 90%).

LCMS:  $t_R = 2,745$  мин за 30-90CD\_3 мин, MS (ESI)  $m/z = 698,4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

$^1\text{H NMR}$ : (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  мл $^{-1}$  7,46-7,38 (m, 2H), 7,35-7,24 (m, 6H), 7,22-7,16 (m, 1H), 6,90-6,78 (m, 4H), 4,29-4,21 (m, 2H), 4,02-3,95 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,66-3,2 (m, 3H), 3,41 (s, 1H), 3,18-3,04 (m, 2H), 2,36-2,17 (m, 5H), 1,71-1,50 (m, 5H), 1,39-1,25 (m, 14H).

#### Соединение 12

Соединение 11 (600 мг, 0,799 ммоль) растворяли в THF (3 мл) и  $\text{H}_2\text{O}$  (1 мл) и добавляли  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (134 мг, 3,20 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 20 °C в течение 1 часа. TLC-мониторинг (DCM:MeOH = 10:1) показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха путем роторного испарения. Остаток растворяли в воде (5 мл) и метаноле (5 мл) и очищали с использованием колонки с

обращенной фазой ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 1:1$ , пик около 35%) с получением целевого соединения 12 (460 мг, выход 100%, соль лития).

LCMS:  $t_R = 1,346$  мин за 10-80CD\_3 мин, MS (ESI)  $m/z = 684,3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

HPLC:  $t_R = 1,879$  мин через 10-80CD\_6 мин.

$^1\text{H}$  NMR: (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  мл $^{-1}$  7,47-7,39 (m, 2H), 7,35-7,24 (m, 6H), 7,22-7,15 (m, 1H), 6,91-6,79 (m, 4H), 4,31-4,18 (m, 2H), 4,02-3,95 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,44-3,33 (m, 2H), 3,18-3,04 (m, 2H), 2,35-2,27 (m, 1H), 2,24-2,10 (m, 4H), 1,70-1,51 (m, 5H), 1,31-1,23 (m, 12H).

#### Соединение 13

Соединение NAG0024 (271 мг, 0,151 ммоль) растворяли в безводном THF (2 мл) и безводном DMF (4 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота и добавляли молекулярное сито 3А. Затем последовательно добавляли соединение 12 (100 мг, 0,151 ммоль), HOBT (25 мг, 0,181 ммоль), DCC (38 мг, 0,181 ммоль) и DIEA (39 мг, 0,302 ммоль). Реакционную смесь оставляли реагировать при 45 °С в течение 16 часов. После того, как анализ LC-MS показал, что реакция была завершена, реакционную смесь гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали, а остаток затем очищали с использованием колонки с обращенной фазой  $\text{C}^{18}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ) с получением соединения 13 (210 мг, выход 57%).

#### Соединение NAG0052

Соединение 13 (230 мг, 0,094 ммоль) растворяли в пиридине (5 мл) при комнатной температуре и добавляли молекулярное сито. Добавляли DMAP (12 мг, 0,283 ммоль) и янтарный ангидрид (28 мг, 0,283 ммоль). Смесь перемешивали при 50 °С в течение 16 ч в атмосфере азота. Анализ LCMS показал, что реакция была завершена. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали досуха путем роторного испарения. После очистки на колонке с обращенной фазой  $\text{C}^{18}$  проводили вторичную очистку с помощью препаративной HPLC с получением целевого соединения NAG0052 (123 мг, 0,048 ммоль, выход 51%).

MS (ESI)  $m/z = 2535,3$   $[\text{M}-1]^-$ . Рассчитано: 2536,2.

$^1\text{H}$  NMR (400 МГц, ацетонитрил- $d_3$ )  $\delta$  7,48-7,43 (m, 2H), 7,37-7,12 (m, 11H), 7,00-6,85 (m, 10H), 6,66 (s, 1H), 5,31 (dd,  $J = 3,4, 1,1$  Гц, 3H), 5,20-5,13 (m, 1H), 5,05 (dd,  $J = 11,3, 3,4$  Гц, 3H), 4,56 (d,  $J = 8,5$  Гц, 3H), 4,30 (dd,  $J = 7,7, 5,3$  Гц, 1H), 4,18-3,93 (m, 14H), 3,79 (s, 10H), 3,65 (q,  $J = 4,7, 3,6$  Гц, 13H), 3,56-3,07 (m, 24H), 2,56 (s, 6H), 2,37 (t,  $J = 5,8$  Гц, 10H), 2,17 (t,  $J = 7,5$  Гц, 9H), 2,02-1,96 (m, 20H), 1,88 (s, 8H), 1,82-1,73 (m, 2H), 1,60 (dt,  $J = 15,0, 7,3$  Гц, 16H), 1,27 (s, 13H).

### Пример 8. Синтез конъюгатов мРНК или дцРНК

#### 1. Получение смолы с подложкой собственными силами

Соединение NAG0052, содержащее группу карбоновой кислоты (157 мг, 0,062 ммоль), растворяли в безводном DMF (3 мл). После полного растворения субстрата последовательно добавляли безводный ацетонитрил (4 мл), DIEA (0,03 мл, 0,154 ммоль, 2,5 экв.) и HBTU (35 мг, 0,093 ммоль, 1,5 экв.). После того, как реакционная смесь хорошо перемешивали, добавляли макропористую аминотетильную смолу (476 мг, загрузка холостого раствора 0,41 ммоль/г, целевая загрузка 0,1 ммоль/г). Реакционную смесь встряхивали в течение ночи на шейкере (температура: 25 °С; скорость вращения: 200 об/мин). Реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали DCM, а затем безводным ацетонитрилом. Твердое вещество собирали и сушили в течение ночи под вакуумом.

Твердое вещество с предыдущей стадии диспергировали в безводном ацетонитриле (5 мл) и последовательно добавляли пиридин (0,18 мл), DMAP (3 мг), NMI (0,12 мл) и CapB1 (2,68 мл). Реакционную смесь встряхивали на шейкере (температура: 25 °С; скорость вращения: 200 об/мин) в течение 2 часов. Реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали безводным ацетонитрилом. Твердое вещество собирали и сушили в течение ночи под вакуумом с получением смолы с подложкой. Нагрузку измеряли при 0,1 ммоль/г.

2. Для NAG0052, который был присоединен к смоле, смолу использовали в качестве начала, и нуклеозидные мономеры присоединяли один за другим в направлении 3'-5' в порядке расположения нуклеотидов. Каждый раз, когда присоединяли нуклеозидный мономер, участвовали четыре реакции – снятие защиты, связывание, кэпирование и окисление или сульфуризация. Способ является общепринятым в данной области техники.

Полученные конъюгаты миРНК или дцРНК имели смысловые и антисмысловые цепи, как показано в таблице 11 и таблице 12.

Таблица 11. конъюгаты миРНК или дцРНК

№ конъюгата миРНК или дцРНК	№ смысловой цепи	№ антисмысловой цепи
TRD002218	TJR4373-SS	TJR0414-AS
TRD007205	TJR013485S	TJR0414-AS

Таблица 12. Последовательности нуклеиновых кислот смысловой и антисмысловой цепей

	№	Направление последовательности 5'-3' (SEQ ID NO:)
Смысловая цепь	TJR4373-SS	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCm UmCmUm AmUmAm Am-L96 (SEQ ID NO:390)
	TJR013485S	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams-NAG0052' (SEQ ID NO:391)
Антисмысловая цепь	TJR0414-AS	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm (SEQ ID NO:392)

Таблица 13. Структуры конъюгатов

№ смысловой цепи конъюгата миРНК или дцРНК	Структура
TJR4373-SS	
TJR013485S	

Конъюгат TRD002218 использовали в качестве эталонного положительного соединения.

Пример 9. *In vivo* ингибирование уровня экспрессии мРНК гена-мишени с помощью конъюгатов миРНК или дцРНК

В этом эксперименте исследовали эффективность конъюгатов миРНК или дцРНК по настоящему изобретению, которые конъюгированы с различными структурами, в ингибировании уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo*.

Самцов мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель случайным образом разделяли на группы по 6, по 3 мыши на временную точку. Этим группам мышей вводили конъюгат по

настоящему изобретению TRD007205, эталонный положительный конъюгат лиганда нуклеиновой кислоты TRD002218 и PBS.

Всем животным вводили однократную дозу путем подкожной инъекции в зависимости от их массы тела. Конъюгаты мРНК или дцРНК вводили в дозе 1 мг/кг (рассчитанной на основе мРНК) в объеме 5 мл/кг. Мышей умерщвляли через 7 дней или 28 дней после введения, и потом их печень собирали и хранили с РНК (Sigma Aldrich). Затем ткань печени гомогенизировали с использованием тканевого гомогенизатора, а общую РНК экстрагировали из ткани печени с использованием набора для экстракции тканевой РНК (FireGen Biomedicals, FG0412), следуя процедуре, описанной в инструкциях. Общая РНК была обратно транскрибирована в кДНК, а уровень экспрессии мРНК TTR в ткани печени измеряли с помощью количественной PCR с флуоресценцией в реальном времени. В методе количественной PCR с флуоресценцией в качестве внутреннего эталонного гена использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), а уровни экспрессии мРНК TTR и GAPDH измеряли с использованием праймеров-зондов Taqman для TTR и GAPDH, соответственно. Последовательности детектирующих праймеров были такими же, как показано в Таблице 9.

Таблица 14. Группы соединения для эксперимента *in vivo* на мышах

№ соединения	Доза	Количественное определение мРНК	Количество животных	Примечание
PBS	-	D7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD002218	1 мг/кг подкожно	D7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD007205	1 мг/кг подкожно	D7, 28	6	3 мыши на временную точку

Уровень экспрессии мРНК TTR рассчитывали в соответствии с приведенным ниже уравнением:

Уровень экспрессии мРНК TTR = [(уровень экспрессии мРНК TTR тестовой группы/уровень экспрессии мРНК GAPDH тестовой группы)/(уровень экспрессии мРНК TTR контрольной группы/уровень экспрессии мРНК GAPDH контрольной группы)]×100%.

Эффективность конъюгатов мРНК или дцРНК по настоящему изобретению, которые конъюгированы с различными структурами, в ингибировании уровня экспрессии

мРНК целевого гена *in vivo* через 7 дней и 28 дней после введения показана на фиг. 1 и фиг. 2, соответственно.

Как видно из результатов на фиг. 1, конъюгат TRD007205 хорошо ингибировал экспрессию мРНК ТТР через 7 дней после введения, что указывает на то, что он может опосредовать более эффективную доставку. Как видно из фиг. 2, через 28 дней после введения TRD007205 ингибировал уровень экспрессии мРНК целевого гена лучше, чем TRD002218.

#### Пример 10. Синтез конъюгатов миРНК-NAG0052

##### 1. Получение смолы с подложкой собственными силами

Процедура была такой же, как и в Примере 8.

2. Смола с NAG0052 использовали в качестве начала, и нуклеозидные мономеры присоединяли один за другим в направлении 3'-5' в порядке расположения нуклеотидов. Каждый раз, когда присоединяли нуклеозидный мономер, участвовали четыре реакции – снятие защит, связывание, кэпирование и окисление или сульфуризация.

В частности, была сделана ссылка на способ синтеза примера 2. Полученные конъюгаты миРНК или дцРНК имели смысловые и антисмысловые цепи, как показано в таблице 15, таблице 16-1 и таблице 16-1.

Таблица 15. Конъюгаты миРНК или дцРНК

Цель	№ конъюгата миРНК или дцРНК	№ смысловой цепи	№ антисмысловой цепи
AGT	TRD008028	TJR014967S	TJR014818A
	TRD008029	TJR014968S	TJR014819A
	TRD008030	TJR014969S	TJR014831A
	TRD008031	TJR014970S	TJR014832A
	TRD008028-1	TJR014967S-1	TJR014818A
	TRD008029-1	TJR014968S-1	TJR014819A
	TRD008030-1	TJR014969S-1	TJR014831A
	TRD008031-1	TJR014970S-1	TJR014832A

Таблица 16-1. Смысловые и антисмысловые цепи конъюгатов миРНК или дцРНК

№	SEQ	Направление	№	SEQ	Направление
---	-----	-------------	---	-----	-------------

одиначной цепи	ID NO	последовательности 5'-3'	одиначной цепи	ID NO	последовательности 5'-3'
TJR014 967S	393	UmsCmsAmAmCfUm GfGfAfUmGmAmAm GmAmAmAmCmUm- NAG0052'	TJR0149 67S-1	397	UmsCmsAmAmCm UmGfGfAfUmGmA mAmGmAmAmAm CmUm-NAG0052'
TJR014 968S	394	CmsGmsUmUmUfCm UfCfCfUmUmGmGm UmCmUmAmAmAm- NAG0052'	TJR0149 68S-1	398	CmsGmsUmUmUm CmUfCfCfUmUmG mGmUmCmUmAm AmAm-NAG0052'
TJR014 969S	395	CmsCmsAmCmAfAm UfGfAfGmAmGmUm AmCmCmUmGmUm- NAG0052'	TJR0149 69S-1	399	CmsCmsAmCmAm AmUfGfAfGmAmG mUmAmCmCmUm GmUm-NAG0052'
TJR014 970S	396	CmsGmsAmCmCfAm GfCfUfUmGmUmUm UmGmUmGmAmAm- NAG0052'	TJR0149 70S-1	400	CmsGmsAmCmCm AmGfCfUfUmGmU mUmUmGmUmGm AmAm-NAG0052'
№ одиначной цепи		Направление последовательности 5'-3'			
TJR014 818A	401	AmsGfsUmUfUmCf(-) )hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfGmUfUmGfAmsGmsGm			
TJR014 819A	402	UmsUfsUmAfGmAf(-) )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm			
TJR014 831A	403	AmsCfsAmGfGmUf(-) )hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfUmGfUmGfGmsAmsUm			
TJR014 832A	404	UmsUfsCmAfCmAf(-) )hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfGmGfUmCfGmsGmsUm			

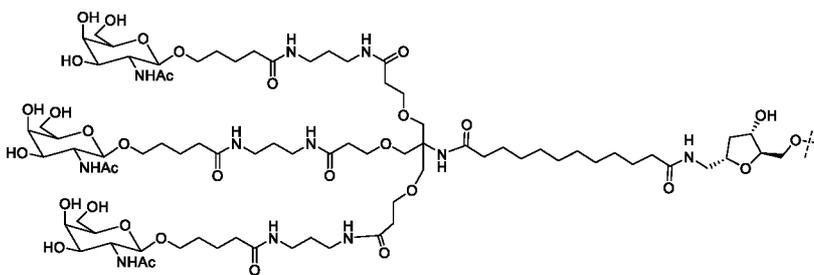
Таблица 16-2. Голые последовательности соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот смысловой и антисмысловой цепей конъюгатов миРНК или дцРНК

№ одиночной цепи	SEQ ID NO	№ голый последовательности, соответствующей одиночной цепи Направление последовательности 5'-3'	№ одиночной цепи	SEQ ID NO	№ голый последовательности, соответствующей одиночной цепи Направление последовательности 5'-3'
TJR014967S	405	UCAACUGGA UGAAGAAAC U	TJR01 4967S- 1	409	UCAACUGGAU GAAGAAACU
TJR014968S	406	CGUUUCUCC UUGGUCUAA A	TJR01 4968S- 1	410	CGUUUCUCCU UGGUCUAAA
TJR014969S	407	CCACAAUGA GAGUACCUG U	TJR01 4969S- 1	411	CCACAAUGAG AGUACCUGU
TJR014970S	408	CGACCAGCU UGUUUGUGA A	TJR01 4970S- 1	412	CGACCAGCUU GUUUGUGAA
№ одиночной цепи	SEQ ID NO	№ голый последовательности, соответствующей одиночной цепи Направление последовательности 5'-3'			
TJR014818A	413	AGUUUCUUCAUCCAGUUGAGG			
TJR014819A	414	UUUAGACCAAGGAGAAACGGC			
TJR014831A	415	ACAGGUACUCUCAUUGUGGAU			
TJR014832A	416	UUCACAAACAAGCUGGUCGGU			

Структуры (-)hmpNA(A), (-)hmpNA(G), (-)hmpNA(C) и (-)hmpNA(U), см. в Примере

4.

Структура NAG0052' представляет собой:



Пример 11. Целевая активность конъюгатов миРНК-NAG0052 на различных мишенях

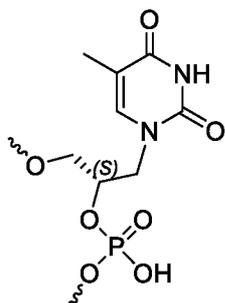
В таблице 17 показан положительный контроль.

Таблица 17. Последовательности соединения положительного контроля

Цель	№ положительного контроля	SEQ ID NO	Смысловая цепь (5'-3')	SEQ ID NO	Антисмысловая цепь (5'-3)
AGT	TRD007779	417	GmsUmsCmAmUmC mCfAmCfAfUmG mAmGmAmGmUmA mCmAmL96	418	UmsGfsUmAmCm GNA(t)CmUmCm AmUmUmGmUfG mGfAmUmGmAm CmsGmsAm

TRD007779 был получен в соответствии с US11015201B;

Структуру GNA(A) см. в Примере 4; структура GNA(t) представляет собой



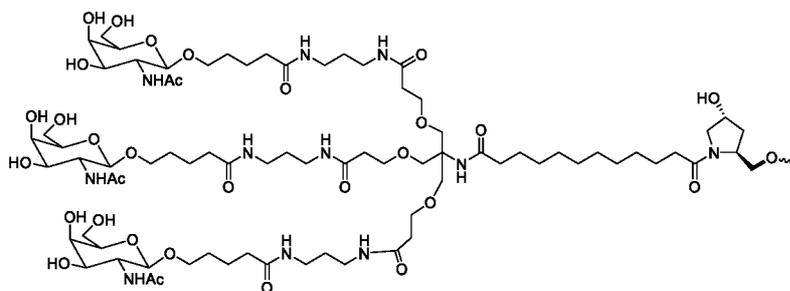
**GNA(T)** ;

структура

L96

представляет

собой



Конъюгаты миРНК или дцРНК в таблице 15 и таблице 17 подвергали моделированию *in vitro* на молекулярном уровне скрининга целевой активности в клетках НЕК293А с использованием 11 градиентов концентрации.

Соответствующие целевые последовательности миРНК конструировали из гена AGT и вставляли в плазмиды psiCHECK-2. Плазмиды содержали ген люциферазы рениллы и ген люциферазы светлячка. Плазмиды представляли собой системы репортерного двойного гена. Целевую последовательность миРНК вставляли в область 3'UTR (3'-нетранслируемая область) гена люциферазы рениллы. Активность миРНК для целевой последовательности отражалась измерениями экспрессии люциферазы рениллы, скорректированной люциферазой светлячка. В измерении использовалась система анализа репортерной двойной люциферазы (Promega, E2940).

Клетки НЕК293А культивировали при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> в среде с высоким содержанием глюкозы DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. За 24 часа до трансфекции клетки НЕК293А инокулировали на 96-луночный планшет с плотностью  $8 \times 10^3$  клеток на лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды.

Клетки совместно трансфицировали миРНК и соответствующей плазмидой с использованием Lipofectamine2000 (ThermoFisher, 11668019) в соответствии с инструкциями. Для каждой лунки использовали 0,2 мкл Lipofectamine2000. Количество плазмиды для трансфекции составляло 20 нг на лунку. Для плазмид целевой последовательности было установлено в общей сложности 11 точек концентрации для миРНК, причем самая высокая конечная концентрация в точке концентрации составляла 20 нМ. Проводили 3-кратное серийное разведение, в результате чего получали 20 нМ, 6,6667 нМ, 2,2222 нМ, 0,7407 нМ, 0,2469 нМ, 0,0823 нМ, 0,0274 нМ, 0,0091 нМ, 0,0030 нМ, 0,0010 нМ и 0,0003 нМ. Через 24 часа после трансфекции целевые уровни определяли с использованием Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, E2940).

Экспериментальные материалы и приборы приведены в таблице 18 и таблице 19. Процесс разведения приведен в таблице 20. Результаты представлены в таблице 21.

Плазмиды Psi-CHECK были приобретены у Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.

Таблица 18. Экспериментальные расходные материалы и реагенты для psi-CHECK

Расходные реагенты				
Наименование	Компания	Номер по каталогу/модель	Серия №	Срок годности
Клетки HEK293A	Cobioer, Nanjing	ATCC-Cobioer/CBP60202	/	/
Система анализа люциферазы Dual-Glo® (Система анализа люциферазы)	Promega	E2940	0000363099	2022/5/13
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	11668-019	/	2022/6/14

Таблица 19. Экспериментальные приборы для psi-CHECK

Аппаратура		
Наименование	Компания	Номер по каталогу/модель
Nanodrop	Thermo	Nanodrop One
Микропланшетный ридер	PerkinElmer	EnVision2105
Graphing software	/	Graph Prism 5

Таблица 20. Протокол разведения нескольких концентраций для образцов

Конечная концентрация миРНК (нМ)	Добавление воды и миРНК
20	4 мкл миРНК (исходный раствор) + 36 мкл H <sub>2</sub> O
6,6667	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
2,2222	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,7407	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,2469	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0823	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0274	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0091	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0030	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0010	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0003	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O

Таблица 21. Результаты скрининга на предмет целевой активности psi-CHECK

Оставшийся процент экспрессии мРНК) гена-мишени (среднее значение)						
Код двойной цепи	20 нМ	6,6667 нМ	2,2222 нМ	0,7407 нМ	0,2469 нМ	0,0823 нМ
TRD007779	20,94%	25,94%	19,71%	22,83%	30,25%	52,84%
TRD008028	15,98%	15,62%	14,82%	15,21%	18,89%	28,25%
TRD008029	19,62%	18,32%	17,67%	16,43%	19,09%	29,18%
TRD008030	22,06%	20,44%	21,77%	23,54%	30,98%	51,09%
TRD008031	24,20%	24,39%	22,08%	22,82%	28,27%	41,84%
Код двойной цепи	0,0274 нМ	0,0091 нМ	0,0030 нМ	0,0010 нМ	0,0003 нМ	GSCM IC <sub>50</sub> (нМ)
TRD007779	80,38%	0,8691	100,43%	98,43%	90,27%	0,0885
TRD008028	46,07%	57,83%	78,32%	87,88%	92,34%	0,0171
TRD008029	43,94%	59,89%	83,88%	84,74%	82,90%	0,0185
TRD008030	79,10%	0,9093	110,38%	106,16%	94,68%	0,0845
TRD008031	65,76%	0,8225	93,05%	97,54%	84,17%	0,0521

Вышеуказанные результаты показывают, что эталонные контроли TRD007779, TRD008028, TRD008029, TRD008030 и TRD008031 имеют высокие уровни целевой ингибирующей активности в отношении гена AGT в системе psiCHECK.

Пример 12. Ингибирование человеческого AGT в клетках Huh7 - ингибирующая активность по 7 точкам концентрации

Конъюгаты миРНК или дцРНК в таблице 15 и таблице 17 подвергали скринингу активности клеток Huh7 в клетках Huh7 с использованием 11 градиентов концентрации. Начальная конечная концентрация каждого образца для трансфекции составляла 10 нМ, и проводили 5-кратное серийное разведение для получения 7 точек концентрации.

Клетки Huh7 культивировали при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в среде с высоким содержанием глюкозы DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. За 24 часа до трансфекции клетки Huh7 инокулировали на 96-луночный планшет с плотностью 10000 клеток на лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды.

Клетки трансфицировали образцами с использованием Lipofectamine RNAi MAX

(ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ, 0,016 нМ, 0,0032 нМ и 0,00064 нМ. Через 24 часа после обработки экстрагировали общую клеточную РНК с использованием набора для высокопроизводительной клеточной экстракции РНК и проводили обратную транскрипцию РНК и количественную детекцию PCR в реальном времени. Уровень мРНК AGT человека измеряли и корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH.

Результаты выражены относительно оставшегося процента экспрессии мРНК AGT человека в клетках, обработанных контрольным образцом. Результаты скорости ингибирования IC<sub>50</sub> показаны в таблице 22.

Таблица 22. Многодозовая ингибирующая активность в отношении AGT человека в Huh7

№ конъюгата миРНК или дцРНК	Оставшийся процент экспрессии мРНК (Huh7) гена-мишени (среднее значение)							Значение IC <sub>50</sub> (нМ)
	10 нМ	2 нМ	0,4 нМ	0,08 нМ	0,016 нМ	0,0032 нМ	0,00064 нМ	
TRD008028	15,78 %	28,84 %	30,04 %	56,13 %	83,80%	98,80%	99,84%	0,1072
TRD008029	19,93 %	29,35 %	28,36 %	47,77 %	77,51%	95,34%	97,08%	0,0692
TRD008030	18,25 %	26,25 %	33,09 %	54,32 %	76,46%	91,36%	83,78%	0,1096
TRD008031	20,14 %	26,06 %	38,04 %	61,23 %	93,19%	103,16 %	100,07 %	0,1585

Результаты показывают, что TRD008028, TRD008029, TRD008030 и TRD008031 имеют превосходную ингибирующую активность в отношении AGT в клетках Huh7.

Пример 13. Ингибирование человеческого AGT в клетках Hep3B - ингибирующая активность по 7 точкам концентрации

Образцы подвергали скринингу активности в клетках Hep3B с использованием 7 градиентов концентрации. Начальная конечная концентрация каждого образца для трансфекции составляла 10 нМ, и проводили 5-кратное серийное разведение для получения 7 точек концентрации.

Клетки Hep3B культивировали при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в среде MEM, содержащей 10%

фетальной бычьей сыворотки. За 24 часа до трансфекции клетки Hep3B инокулировали на 96-луночный планшет с плотностью 10000 клеток на лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды.

Клетки трансфицировали образцами с использованием Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ, 0,016 нМ, 0,0032 нМ и 0,00064 нМ. Через 24 часа после обработки экстрагировали общую клеточную РНК с использованием набора для высокопроизводительной клеточной экстракции РНК и проводили обратную транскрипцию РНК и количественную детекцию PCR в реальном времени. Уровень мРНК AGT человека измеряли и корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH.

Результаты выражены относительно оставшегося процента экспрессии мРНК AGT человека в клетках, обработанных контрольным образцом. Результаты скорости ингибирования IC<sub>50</sub> показаны в таблице 23.

Таблица 23. Многодозовая ингибирующая активность в отношении AGT человека в Hep3B

№	Оставшийся процент экспрессии мРНК (Hep3B) гена-мишени (среднее значение)							Значение IC <sub>50</sub> (нМ)
	10 нМ	2 нМ	0,4 нМ	0,08 нМ	0,016 нМ	0,0032 нМ	0,00064 нМ	
TRD008028	17,04 %	24,90 %	38,71 %	53,23 %	81,87 %	91,96%	100,22%	0,1318
TRD008029	17,97 %	22,05 %	42,58 %	44,35 %	71,44 %	88,81%	100,34%	0,0851
TRD008030	15,18 %	23,69 %	33,91 %	57,68 %	91,42 %	97,66%	100,21%	0,1318
TRD008031	14,69 %	16,16 %	26,27 %	56,92 %	81,95 %	94,32%	100,11%	0,1000

Результаты показывают, что TRD008028, TRD008029, TRD008030 и TRD008031 имеют превосходную ингибирующую активность в отношении AGT в клетках Hep3B.

Часть третья. Биологическая оценка нацеливания AGT

Пример 14. Конструирование миРНК AGT человека

С геном AGT человека (NM\_001384479.1) в качестве гена-мишени, миРНК

нуклеотиды 19/21 были сконструированы в соответствии с общими правилами для активных миРНК. Последовательности немодифицированных смысловых и антисмысловых цепей подробно описаны в таблице 24 и таблице 25; антисмысловые цепи с химической модификацией в положении 7 подробно описаны в таблице 24; модифицированные смысловые и антисмысловые цепи показаны в таблице 26, таблице 27 и таблице 28; в настоящем описании также предложены последовательности смысловых и антисмысловых цепей в таблице 26, таблице 27 и таблице 28, не содержащие фосфоротиоатных групп.

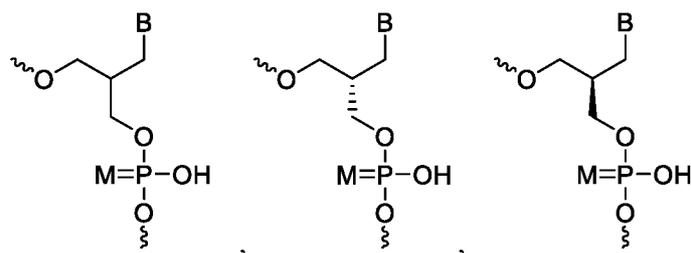
Таблица 24. Немодифицированные смысловые и антисмысловые цепи миРНК человека; антисмысловые цепи с химической модификацией в положении 7

№ двухцепочечной немодифицированной последовательности	SEQ ID NO:	Немодифицированная цепь SS (5'-3')	SEQ ID NO:	Немодифицированная цепь AS (5'-3')	SEQ ID NO:	AS цепь с модификацией в положении 7 (5'-3')
TJR100283	1	CGUUUCUCC UUGGUCUAA A	7	UUUAGACCAA GGAGAAACGG C	13	UUUAGAW'CAA GGAGAAACGG C
TJR100299	2	CAUGCACAG UGAGCUAUG A	8	UCAUAGCUCAC UGUGCAUGCC	14	UCAUAGW'UCA CUGUGCAUGCC
TJR100320	3	GGUGCUGCA AGGAUCUUA U	9	AUAAGAUCU UGCAGCACCAG	15	AUAAGAW'CCU UGCAGCACCAG
	4	UCAACUGGA UGAAGAAAC U	10	AGUUUCUUCA UCCAGUUGAG G	16	AGUUUCW'UCA UCCAGUUGAG G
	5	CCACAAUGA GAGUACCUG U	11	ACAGGUACUCU CAUUGUGGAU	17	ACAGGUW'CUC UCAUUGUGGA U

	6	CGACCAGCU UGUUUGUGA A	12	UUCACAAACAA GCUGGUCGGU	18	UUCACAW'ACA AGCUGGUCGG U
--	---	-----------------------------	----	---------------------------	----	--------------------------------

При синтезе модифицированного нуклеотида в положении 7 5'-конца цепи AS исходный нуклеотид исходной последовательности заменяли фосфорамидитным мономером, синтезированным в Примере 1, или 2'-метокси-модифицированным фосфорамидитным мономером. W' выбран из группы, состоящей из:

нуклеотида, модифицированного химической модификацией, представленной



или ее таутомером, или 2'-метокси-

модифицированного нуклеотида;

где М представляет собой О или S;

В выбран из группы, состоящей из оснований, соответствующих положению 7 5'-конца SEQ ID NO: 7 до SEQ ID NO: 12 в таблице 24. Например, SEQ ID NO: 13 соответствует SEQ ID NO: 7, и SEQ ID NO: 17 соответствует SEQ ID NO: 11.

Таблица 25. Немодифицированные смысловые и антисмысловые цепи мРНК человека

№ двойной цепи	SEQ ID NO:	Немодифицированная цепь SS (5'-3')	SEQ ID NO:	Немодифицированная цепь AS (5'-3')
	19	GAUCUUAUGACCUGCAG GA	77	UCCUGCAGGUCAUAAGAU CCU
	20	GUUUCUCCUUGGUCUAA GU	78	ACUUAGACCAAGGAGAAA CGG
	21	CGUAUAUAUGGCAUGCA CA	79	UGUGCAUGCCAUAUAUAC GGA
	22	GUAUAUAUGGCAUGCAC AA	80	UUGUGCAUGCCAUAUAUA CGG
	23	UAUAUAUGGCAUGCACA	81	ACUGUGCAUGCCAUAUAU

		GU		ACG
	24	AUAUAUGGCAUGCACAG UA	82	UACUGUGCAUGCCAUAUA UAC
	25	UAUAUGGCAUGCACAGU GA	83	UCACUGUGCAUGCCAUAU AUA
	26	AUAUGGCAUGCACAGUG AA	84	UUCACUGUGCAUGCCAUA UAU
	27	UAUGGCAUGCACAGUGA GA	85	UCUCACUGUGCAUGCCA AUA
	28	AUGGCAUGCACAGUGAG CU	86	AGCUCACUGUGCAUGCCA UAU
	29	GCAUGCACAGUGAGCUA UA	87	UAUAGCUCACUGUGCAUG CCA
	30	AUGCACAGUGAGCUAUG GA	88	UCCAUAGCUCACUGUGCA UGC
	31	UGCACAGUGAGCUAUGG GA	89	UCCCAUAGCUCACUGUGC AUG
	32	CAGUGAGCUAUGGGGCG UA	90	UACGCCCAUAGCUCACUG UG
	33	AAGGAUCUUAUGACCUG CA	91	UGCAGGUCAUAAGAUCU UGC
	34	AGGAUCUUAUGACCUGC AA	92	UUGCAGGUCAUAAGAUC UUG
	35	GGAUCUUAUGACCUGCA GA	93	UCUGCAGGUCAUAAGAUC CUU
	36	UUUCUCCUUGGUCUAAG UA	94	UACUUAGACCAAGGAGAA ACG
	37	UUCUCCUUGGUCUAAGU GU	95	ACACUUAGACCAAGGAGA AAC
	38	UCUCCUUGGUCUAAGUG UA	96	UACACUUAGACCAAGGAG AAA
	39	UGGCAUGCACAGUGAGC UA	97	UAGCUCACUGUGCAUGCC AUA

	40	GGCAUGCACAGUGAGCU AU	98	AUAGCUCACUGUGCAUGC CAU
TJR1002 86	41	CGUUUCUCCUUGGUCUA AG	99	CUUAGACCAAGGAGAAAC G
TJR1002 90	42	GUUUCUCCUUGGUCUAA GU	100	ACUUAGACCAAGGAGAAA CGG
TJR1002 91	43	UUUCUCCUUGGUCUAAG UG	101	CACUUAGACCAAGGAGAA ACG
TJR1002 92	44	AGCCGUUUCUCCUUGGU CUAA	102	UUAGACCAAGGAGAAACG GCU
TJR1002 93	45	GCCGUUUCUCCUUGGUC UAAG	103	CUUAGACCAAGGAGAAAC GGC
TJR1002 95	46	GUUUCUCCUUGGUCUAA GU	104	ACUUAGACCAAGGAGAAA C
TJR1003 02	47	CAUGCACAGUGAGCUAU GC	105	GCAUAGCUCACUGUGCAU GCC
TJR1003 03	48	GGCAUGCACAGUGAGCU AU	106	AUAGCUCACUGUGCAUGC C
TJR1003 04	49	UAUGGCAUGCACAGUGA GA	107	UCUCACUGUGCAUGCCA A
TJR1003 05	50	ACAGUGAGCUAUGGGGC GU	108	ACGCCCCAUAGCUCACUGU
TJR1003 06	51	AUGGCAUGCACAGUGAG CUAU	109	AUAGCUCACUGUGCAUGC CAUUAU
TJR1003 07	52	UAUGGCAUGCACAGUGA GC	110	GCUCACUGUGCAUGCCA AUU
TJR1003 08	53	AUGGCAUGCACAGUGAG CU	111	AGCUCACUGUGCAUGCCA UAU
TJR1003 09	54	UGGCAUGCACAGUGAGC UA	112	UAGCUCACUGUGCAUGCC AUA
TJR1003 10	55	GGCAUGCACAGUGAGCU AU	113	AUAGCUCACUGUGCAUGC CAU
TJR1003	56	GCAUGCACAGUGAGCUA	114	CAUAGCUCACUGUGCAUG

11		UG		CCA
TJR1003 12	57	AUGCACAGUGAGCUAUG GG	115	CCCAUAGCUCACUGUGCA UGC
TJR1003 13	58	UGCACAGUGAGCUAUGG GG	116	CCCCAUAGCUCACUGUGCA UG
TJR1003 21-1	59	UGCACAGUGAGCUAUGG GG	117	CCCCAUAGCUCACUGUGCA UG
TJR1003 22	60	GGUGCUGCAAGGAUCUU AG	118	CUAAGAUCUUGCAGCAC CAG
TJR1003 23	61	GGUGCUGCAAGGAUCUU AC	119	GUAAGAUCUUGCAGCAC CAG
TJR1003 24	62	UGCUGCAAGGAUCUU GA	120	UCAUAAGAUCUUGCAGC A
TJR1003 25	63	UGGUGCUGCAAGGAUCU UA	121	UAAGAUCUUGCAGCACC AGU
TJR1003 26	64	CUGGUGCUGCAAGGAUC UU	122	AAGAUCUUGCAGCACCA GUU
TJR1003 27	65	GUGCUGCAAGGAUCUUA UG	123	CAUAAGAUCUUGCAGCA CCA
TJR1003 28	66	UGCUGCAAGGAUCUU GA	124	UCAUAAGAUCUUGCAGC ACC
TRD0321 -1	67	GCAUUUUUUUGAGCUU GA	125	UCAAGCUCAAAAAAAAAUG CUG
TJR1001 93-1	68	GCCGUUUCUCCUUGGUC UAAU	126	AUUAGACCAAGGAGAAAC GGC
TJR1001 92-1	69	GCCGUUUCUCCUUGGUC UAAC	127	GUUAGACCAAGGAGAAAC GGC
TJR1001 89-1	70	AGCCGUUUCUCCUUGGU CUAA	128	UUAGACCAAGGAGAAACG GCUUU
TJR1001 67-1	71	GUUUCUCCUUGGUCUAA GU	129	ACUUAGACCAAGGAGAAA C
TJR1001 62-1	72	GCAUUUUUUUGAGCUU GA	130	UCAAGCUCAAAAAAAAAUG CUG

TJR1001 61-1	73	GCAUUUUUUUUGAGCUU GA	131	UCAAGCUCAAAAAAAUG CUG
TJR1001 60-1	74	GCAUUUUUUUUGAGCUU GAAG	132	UCAAGCUCAAAAAAAUG CUG
TJR1001 91-1	75	GCCGUUUCUCCUUGGUC UAAG	133	CUUAGACCAAGGAGAAAC GGC
TJR1001 90-1	76	AGCCGUUUCUCCUUGGU CUAA	134	UUAGACCAAGGAGAAACG GCU

Таблица 26. Модифицированные смысловые и антисмысловые цепи

№ двойной цепи	SEQ ID NO:	SS цепь (5'-3')	SEQ ID NO:	AS цепь (5'-3')
TRD007716	135	CmsAmsUmGmCfAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	189	UmsCfsAmUmAmGfCmUmCmAm CmUmGmUfGmCfAmUmGmsCms Cm
TRD007770	136	CmsGmsUmUmUfCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	190	UmsUfsUmAmGmAfCmCmAmAm GmGmAmGfAmAfAmCmGmsGms Cm
TRD007920	137	CmsGmsUmUmUfCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA msAm	191	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm
TRD007925	138	CmsAmsUmGmCfAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG msAm	192	UmsCfsAmUfAmGf(- )hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCmsCm
TJR100072	139	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	193	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
TJR100073	140	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	194	UmsCfsAmUfAmGf(- )hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCmsCm
TJR100075	141	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGm AmUmCmUmUmAm Um	195	AmsUfsAmAfGmAf(- )hmpNA(U)CmCmUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAmsGm

TJR100076	142	GmsCmsAmGmCmCmGfUfUf UmCmUm CmCmUmUmGmGm Um	196	AmsCfsCmAfAmGfGmAmGmAfA mAfCmGfGmCfUmGfCmsUmsUm
TRD008096 -1	143	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	197	UmsUfsUmAfGmAfCmCmAmAfG mGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
	144	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	198	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm
	145	CmsGmsUmUmUfCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	199	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm
	146	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	200	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
	147	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	201	UmsCfsAmUfAmGf(- )hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCmsCm
	148	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	202	UmsUfsUmAfGmAfCmCmAmAfG mGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
	149	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	203	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm
	150	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm	204	AmsUfsAmAfGmAf(- )hmpNA(U)CmCmUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAmsGm
	151	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm	205	AmsUfsAmAfGmAfUmCmCmUfU mGfCmAfGmCfAmCfCmsAmsGm
	152	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	206	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm

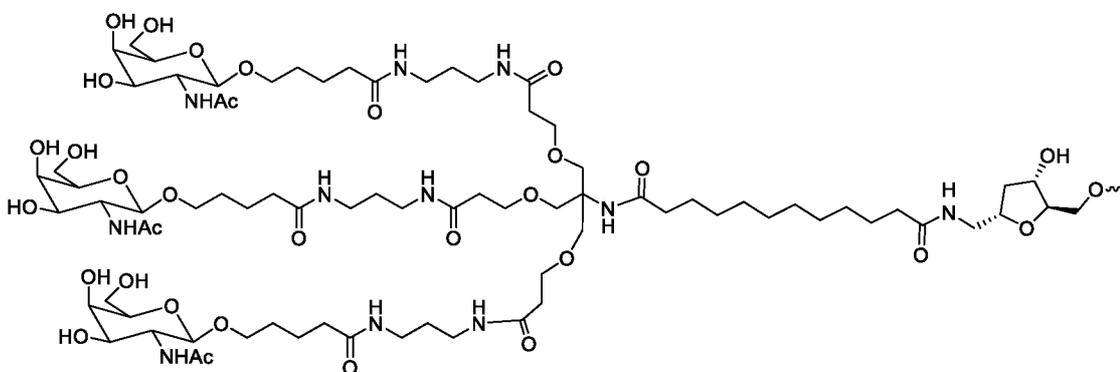
	153	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm	207	UmsUfsUmAfGmAfCmCmAmAfG mGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
	154	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	208	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
	155	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	209	UmsCfsAmUfAmGf(- )hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCmsCm
	156	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm	210	AmsUfsAmAfGmAf(- )hmpNA(U)CmCmUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAmsGm
	157	UmsCmsAmAmCfUmGfGfAf UmGmAmAmGmAmAmAmC mUm	211	AmsGfsUmUfUmCf(- )hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGmsGm
	158	CmsCmsAmCmAfAmUfGfAf GmAmGmUmAmCmCmUmG mUm	212	AmsCfsAmGfGmUf(- )hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAmsUm
	159	CmsGmsAmCmCfAmGfCfUf UmGmUmUmUmGmUmGmA mAm	213	UmsUfsCmAfCmAf(- )hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfG mGfUmCfGmsGmsUm
	160	UmsCmsAmAmCmUmGfGfAf UmGmAmAmGmAmAmAmC mUm	214	AmsGfsUmUfUmCf(- )hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGmsGm
	161	CmsCmsAmCmAmAmUfGfAf GmAmGmUmAmCmCmUmG mUm	215	AmsCfsAmGfGmUf(- )hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAmsUm
	162	CmsGmsAmCmCmAmGfCfUf UmGmUmUmUmGmUmGmA mAm	216	UmsUfsCmAfCmAf(- )hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfG mGfUmCfGmsGmsUm
TRD008096	163	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm-NAG0052	217	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm

TRD008029	164	CmsGmsUmUmUfCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm-NAG0052	218	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm
TJR100104	165	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm-L96	219	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
TJR100103	166	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm-L96	220	UmsCfsAmUfAmGf(- )hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCmsCm
TJR100102	167	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm-L96	221	UmsUfsUmAfGmAfCmCmAmAfG mGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
TJR100101	168	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm-L96	222	UmsUfsUmAfGmAf(- )hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGmsCm
TJR100100	169	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm-L96	223	AmsUfsAmAfGmAf(- )hmpNA(U)CmCmUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAmsGm
TJR100099	170	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm-L96	224	AmsUfsAmAfGmAfUmCmCmUfU mGfCmAfGmCfAmCfCmsAmsGm
TJR100072	171	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm	225	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
TJR100053	172	CmsGmsUmUmUmCmUfCfCf UmUmGmGmUmCmUmAmA mAm-NAG0052	226	UmsUfsUmAfGmAfCmCmAmAfG mGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
TJR100024	173	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm-NAG0052	227	UmsCfsAmUfAmGfCmUmCmAfCm UfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
TJR100023	174	CmsAmsUmGmCmAmCfAfGf UmGmAmGmCmUmAmUmG mAm-NAG0052	228	UmsCfsAmUfAmGf(- )hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCmsCm

TJR100019	175	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm-NAG0052	229	AmsUfsAmAfGmAf(- )hmpNA(U)CmCmUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAmsGm
TJR100296	176	GmsGmsUmGmCmUmGfCfAf AmGmGmAmUmCmUmUmA mUm-NAG0052	230	AmsUfsAmAfGmAfUmCmCmUfU mGfCmAfGmCfAmCfCmsAmsGm
TRD008028	177	UmsCmsAmAmCfUmGfGfAf UmGmAmAmGmAmAmAmC mUm-NAG0052	231	AmsGfsUmUfUmCf(- )hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGmsGm
TRD008030	178	CmsCmsAmCmAfAmUfGfAf GmAmGmUmAmCmCmUmG mUm-NAG0052	232	AmsCfsAmGfGmUf(- )hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAmsUm
TRD008031	179	CmsGmsAmCmCfAmGfCfUf UmGmUmUmUmGmUmGmA mAm-NAG0052	233	UmsUfsCmAfCmAf(- )hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfG mGfUmCfGmsGmsUm
TRD008028 -1	180	UmsCmsAmAmCmUmGfGfAf UmGmAmAmGmAmAmAmC mUm-NAG0052	234	AmsGfsUmUfUmCf(- )hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGmsGm
TRD008030 -1	181	CmsCmsAmCmAmAmUfGfAf GmAmGmUmAmCmCmUmG mUm-NAG0052	235	AmsCfsAmGfGmUf(- )hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAmsUm
TRD008031 -1	182	CmsGmsAmCmCmAmGfCfUf UmGmUmUmUmGmUmGmA mAm-NAG0052	236	UmsUfsCmAfCmAf(- )hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfG mGfUmCfGmsGmsUm
	183	UmsCmsAmAmCfUmGfGfAf UmGmAmAmGmAmAmAmC mUm-NAG0052	237	AmsGfsUmUfUmCfUmUmCmAfU mCfCmAfGmUfUmGfAmsGmsGm
	184	CmsCmsAmCmAfAmUfGfAf GmAmGmUmAmCmCmUmG mUm-NAG0052	238	AmsCfsAmGfGmUfAmCmUmCfU mCfAmUfUmGfUmGfGmsAmsUm
	185	CmsGmsAmCmCfAmGfCfUf UmGmUmUmUmGmUmGmA mAm-NAG0052	239	UmsUfsCmAfCmAfAmAmCmAfA mGfCmUfGmGfUmCfGmsGmsUm

	186	UmsCmsAmAmCmUmGfGfAf UmGmAmAmGmAmAmAmC mUm-NAG0052	240	AmsGfsUmUfUmCfUmUmCmAfU mCfCmAfGmUfUmGfAmsGmsGm
	187	CmsCmsAmCmAmAmUfGfAf GmAmGmUmAmCmCmUmG mUm-NAG0052	241	AmsCfsAmGfGmUfAmCmUmCfU mCfAmUfUmGfUmGfGmsAmsUm
	188	CmsGmsAmCmCmAmGfCfUf UmGmUmUmUmGmUmGmA mAm-NAG0052	242	UmsUfsCmAfCmAfAmAmCmAfA mGfCmUfGmGfUmCfGmsGmsUm

Структура NAG0052 представляет собой:



Структура L96 представляет собой:

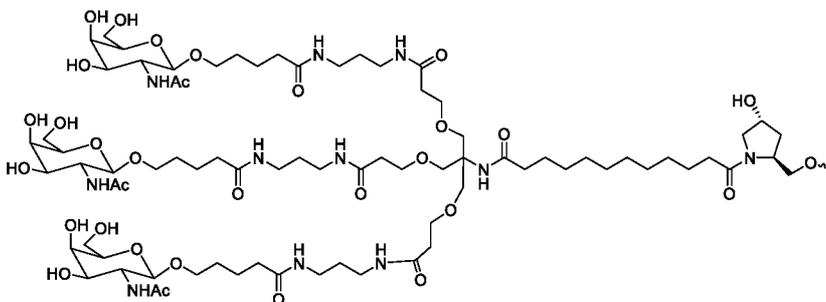


Таблица 27. Дифференциальные оптические химические модификации в положении 7 цепей AS

SEQ ID NO:	AS цепь (5'-3')	SEQ ID NO:	AS цепь (5'-3')	SEQ ID NO:	AS цепь (5'-3')
191	UmsUfsUmAfGmAf(-) hmpNA(C)CmAf	243	UmsUfsUmAfGmA f(+)hmpNA(C)CmA	273	UmsUfsUmAfGm AfhmpNA(C)CmA

	GmGfAmGfAmAfAm CfGmsGmsCm		AmAfGmGfAmGf AmAfAmCfGmsG msCm		mAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGm sCm
192	UmsCfsAmUfAmGf(-) )hmpNA(C)UmCmAf CmUfGmUfGmCfAm UfGmsCmsCm	244	UmsCfsAmUfAmG f(+)hmpNA(C)Um CmAfCmUfGmUf GmCfAmUfGmsC msCm	274	UmsCfsAmUfAm GfhmpNA(C)UmC mAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCm sCm
194	UmsCfsAmUfAmGf(-) )hmpNA(C)UmCmAf CmUfGmUfGmCfAm UfGmsCmsCm	245	UmsCfsAmUfAmG f(+)hmpNA(C)Um CmAfCmUfGmUf GmCfAmUfGmsC msCm	275	UmsCfsAmUfAm GfhmpNA(C)UmC mAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCm sCm
195	AmsUfsAmAfGmAf(-) )hmpNA(U)CmCmUf UmGfCmAfGmCfAm CfCmsAmsGm	246	AmsUfsAmAfGmA f(+)hmpNA(U)Cm CmUfUmGfCmAf GmCfAmCfCmsA msGm	276	AmsUfsAmAfGm AfhmpNA(U)CmC mUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAm sGm
198	UmsUfsUmAfGmAf(-) )hmpNA(C)CmAfAm GmGfAmGfAmAfAm CfGmsGmsCm	247	UmsUfsUmAfGmA f(+)hmpNA(C)Cm AmAfGmGfAmGf AmAfAmCfGmsG msCm	277	UmsUfsUmAfGm AfhmpNA(C)CmA mAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGm sCm
199	UmsUfsUmAfGmAf(-) )hmpNA(C)CmAfAm GmGfAmGfAmAfAm CfGmsGmsCm	248	UmsUfsUmAfGmA f(+)hmpNA(C)Cm AmAfGmGfAmGf AmAfAmCfGmsG msCm	278	UmsUfsUmAfGm AfhmpNA(C)CmA mAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGm sCm
201	UmsCfsAmUfAmGf(-) )hmpNA(C)UmCmAf CmUfGmUfGmCfAm UfGmsCmsCm	249	UmsCfsAmUfAmG f(+)hmpNA(C)Um CmAfCmUfGmUf GmCfAmUfGmsC msCm	279	UmsCfsAmUfAm GfhmpNA(C)UmC mAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCm sCm

203	UmsUfsUmAfGmAf(-) hmpNA(C)CmAmAf GmGfAmGfAmAfAm CfGmsGmsCm	250	UmsUfsUmAfGmA f(+)hmpNA(C)Cm AmAfGmGfAmGf AmAfAmCfGmsG msCm	280	UmsUfsUmAfGm AfhmpNA(C)CmA mAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGm sCm
204	AmsUfsAmAfGmAf(-) hmpNA(U)CmCmUf UmGfCmAfGmCfAm CfCmsAmsGm	251	AmsUfsAmAfGmA f(+)hmpNA(U)Cm CmUfUmGfCmAf GmCfAmCfCmsA msGm	281	AmsUfsAmAfGm AfhmpNA(U)CmC mUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAm sGm
209	UmsCfsAmUfAmGf(-) hmpNA(C)UmCmAf CmUfGmUfGmCfAm UfGmsCmsCm	252	UmsCfsAmUfAmG f(+)hmpNA(C)Um CmAfCmUfGmUf GmCfAmUfGmsC msCm	282	UmsCfsAmUfAm GfhmpNA(C)UmC mAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCm sCm
210	AmsUfsAmAfGmAf(-) hmpNA(U)CmCmUf UmGfCmAfGmCfAm CfCmsAmsGm	253	AmsUfsAmAfGmA f(+)hmpNA(U)Cm CmUfUmGfCmAf GmCfAmCfCmsA msGm	283	AmsUfsAmAfGm AfhmpNA(U)CmC mUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAm sGm
211	AmsGfsUmUfUmCf(-) hmpNA(U)UmCmAf UmCfCmAfGmUfUm GfAmsGmsGm	254	AmsGfsUmUfUmC f(+)hmpNA(U)Um CmAfUmCfCmAf GmUfUmGfAmsG msGm	284	AmsGfsUmUfUm CfhmpNA(U)UmC mAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGm sGm
212	AmsCfsAmGfGmUf(-) hmpNA(A)CmUmCf UmCfAmUfUmGfUm GfGmsAmsUm	255	AmsCfsAmGfGmU f(+)hmpNA(A)Cm UmCfUmCfAmUf UmGfUmGfGmsA msUm	285	AmsCfsAmGfGm UfhmpNA(A)CmU mCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAm sUm
213	UmsUfsCmAfCmAf(-) hmpNA(A)AmCmAf AmGfCmUfGmGfUm CfGmsGmsUm	256	UmsUfsCmAfCmA f(+)hmpNA(A)Am CmAfAmGfCmUf	286	UmsUfsCmAfCm AfhmpNA(A)AmC mAfAmGfCmUfG

			GmGfUmCfGmsGmsUm		mGfUmCfGmsGmsUm
214	AmsGfsUmUfUmCf(-)hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfGmUfUmGfAmsGmsGm	257	AmsGfsUmUfUmCf(+hmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfGmUfUmGfAmsGmsGm	287	AmsGfsUmUfUmCfhmpNA(U)UmCmAfUmCfCmAfGmUfUmGfAmsGmsGm
215	AmsCfsAmGfGmUf(-)hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfUmGfUmGfGmsAmsUm	258	AmsCfsAmGfGmUf(+hmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfUmGfUmGfGmsAmsUm	288	AmsCfsAmGfGmUfhmpNA(A)CmUmCfUmCfAmUfUmGfUmGfGmsAmsUm
216	UmsUfsCmAfCmAf(-)hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfGmGfUmCfGmsGmsUm	259	UmsUfsCmAfCmAf(+hmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfGmGfUmCfGmsGmsUm	289	UmsUfsCmAfCmAfhmpNA(A)AmCmAfAmGfCmUfGmGfUmCfGmsGmsUm
217	UmsUfsUmAfGmAf(-)hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm	260	UmsUfsUmAfGmAf(+hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm	290	UmsUfsUmAfGmAfhmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
218	UmsUfsUmAfGmAf(-)hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm	261	UmsUfsUmAfGmAf(+hmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm	291	UmsUfsUmAfGmAfhmpNA(C)CmAmAfGmGfAmGfAmAfAmCfGmsGmsCm
220	UmsCfsAmUfAmGf(-)hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm	262	UmsCfsAmUfAmGf(+hmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm	292	UmsCfsAmUfAmGfhmpNA(C)UmCmAfCmUfGmUfGmCfAmUfGmsCmsCm
222	UmsUfsUmAfGmAf(-)hmpNA(C)CmAmAf	263	UmsUfsUmAfGmAf(+hmpNA(C)Cm	293	UmsUfsUmAfGmAfhmpNA(C)CmA

	GmGfAmGfAmAfAm CfGmsGmsCm		AmAfGmGfAmGf AmAfAmCfGmsG msCm		mAfGmGfAmGfA mAfAmCfGmsGm sCm
223	AmsUfsAmAfGmAf(-) hmpNA(U)CmCmUf UmGfCmAfGmCfAm CfCmsAmsGm	264	AmsUfsAmAfGmA f(+)hmpNA(U)Cm CmUfUmGfCmAf GmCfAmCfCmsA msGm	294	AmsUfsAmAfGm AfhmpNA(U)CmC mUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAm sGm
228	UmsCfsAmUfAmGf(-) hmpNA(C)UmCmAf CmUfGmUfGmCfAm UfGmsCmsCm	265	UmsCfsAmUfAmG f(+)hmpNA(C)Um CmAfCmUfGmUf GmCfAmUfGmsC msCm	295	UmsCfsAmUfAm GfhmpNA(C)UmC mAfCmUfGmUfG mCfAmUfGmsCm sCm
229	AmsUfsAmAfGmAf(-) hmpNA(U)CmCmUf UmGfCmAfGmCfAm CfCmsAmsGm	266	AmsUfsAmAfGmA f(+)hmpNA(U)Cm CmUfUmGfCmAf GmCfAmCfCmsA msGm	296	AmsUfsAmAfGm AfhmpNA(U)CmC mUfUmGfCmAfG mCfAmCfCmsAm sGm
231	AmsGfsUmUfUmCf(-) hmpNA(U)UmCmAf UmCfCmAfGmUfUm GfAmsGmsGm	267	AmsGfsUmUfUmC f(+)hmpNA(U)Um CmAfUmCfCmAf GmUfUmGfAmsG msGm	297	AmsGfsUmUfUm CfhmpNA(U)UmC mAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGm sGm
232	AmsCfsAmGfGmUf(-) hmpNA(A)CmUmCf UmCfAmUfUmGfUm GfGmsAmsUm	268	AmsCfsAmGfGmU f(+)hmpNA(A)Cm UmCfUmCfAmUf UmGfUmGfGmsA msUm	298	AmsCfsAmGfGm UfhmpNA(A)CmU mCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAm sUm
233	UmsUfsCmAfCmAf(-) hmpNA(A)AmCmAf AmGfCmUfGmGfUm CfGmsGmsUm	269	UmsUfsCmAfCmA f(+)hmpNA(A)Am CmAfAmGfCmUf GmGfUmCfGmsG msUm	299	UmsUfsCmAfCm AfhmpNA(A)AmC mAfAmGfCmUfG mGfUmCfGmsGm sUm

234	AmsGfsUmUfUmCf(-) hmpNA(U)UmCmAf UmCfCmAfGmUfUm GfAmsGmsGm	270	AmsGfsUmUfUmC f(+)hmpNA(U)Um CmAfUmCfCmAf GmUfUmGfAmsG msGm	300	AmsGfsUmUfUm CfhmpNA(U)UmC mAfUmCfCmAfG mUfUmGfAmsGm sGm
235	AmsCfsAmGfGmUf(-) hmpNA(A)CmUmCf UmCfAmUfUmGfUm GfGmsAmsUm	271	AmsCfsAmGfGmU f(+)hmpNA(A)Cm UmCfUmCfAmUf UmGfUmGfGmsA msUm	301	AmsCfsAmGfGm UfhmpNA(A)CmU mCfUmCfAmUfU mGfUmGfGmsAm sUm
236	UmsUfsCmAfCmAf(-) hmpNA(A)AmCmAf AmGfCmUfGmGfUm CfGmsGmsUm	272	UmsUfsCmAfCmA f(+)hmpNA(A)Am CmAfAmGfCmUf GmGfUmCfGmsG msUm	302	UmsUfsCmAfCm AfhmpNA(A)AmC mAfAmGfCmUfG mGfUmCfGmsGm sUm

Таблица 28. Модифицированные смысловые и антисмысловые цепи

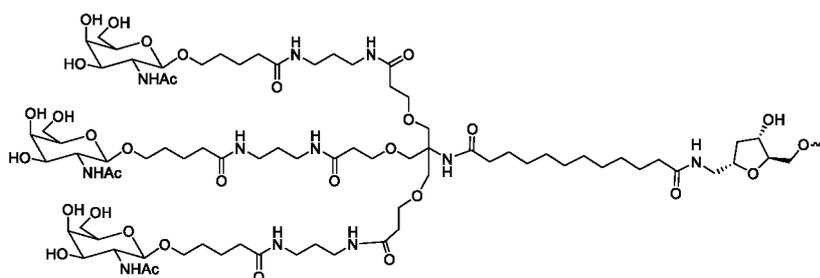
№ двойной цепи	SEQ ID NO:	SS цепь (5'-3')	SEQ ID NO:	AS цепь (5'-3')
TRD007751	303	GmsAmsUmCmUfUmA fUfGfAmCmCmUmGm CmAmsGmGmAms	336	UmsCfsCmUmGmCfAmG mGmUmCmAmsUfAmG fAmUmCmsCmsUm
TRD007771	304	GmsUmsUmUmCfUmCf CfUfUmGmGmUmCmU mAmsGmUm	337	AmsCfsUmUmAmGfAmC mCmAmsGmGmAfGmA fAmAmCmsGmsGm
TRD007343	305	CmsGmsUmAmUfAmU fAfUfGmGmCmAmsUm GmCmAmsGmAms	338	UmsGfsUmGmCmAfUmG mCmCmAmsUmAmUfAmU fAmCmGmsGmsAm
TRD007344	306	GmsUmsAmUmAfUmA fUfGfGmCmAmsUmGm CmAmsGmAms	339	UmsUfsGmUmGmCfAmU mGmCmCmAmsUfAmA fUmAmCmsGmsGm
TRD007345	307	UmsAmsUmAmUfAmU fGfGfCmAmsUmGmCm AmCmAmsGmUm	340	AmsCfsUmGmUmGfCmA mUmGmCmCmAmsUfAmU fAmUmAmsCmsGm

TRD007346	308	AmsUmsAmUmAfUmG fGfCfAmUmGmCmAm CmAmGmUmAm	341	UmsAfsCmUmGmUfGmC mAmUmGmCmCmAfUmA fUmAmUmsAmsCm
TRD007347	309	UmsAmsUmAmUfGmG fCfAfUmGmCmAmCm AmGmUmGmAm	342	UmsCfsAmCmUmGfUmG mCmAmUmGmCmCfAmU fAmUmAmsUmsAm
TRD007348	310	AmsUmsAmUmGfGmC fAfUfGmCmAmCmAm GmUmGmAmAm	343	UmsUfsCmAmCmUfGmU mGmCmAmUmGmCfCmA fUmAmUmsAmsUm
TRD007349	311	UmsAmsUmGmGfCmA fUfGfCmAmCmAmGm UmGmAmGmAm	344	UmsCfsUmCmAmCfUmG mUmGmCmAmUmGfCmC fAmUmAmsUmsAm
TRD007350	312	AmsUmsGmGmCfAmU fGfCfAmCmAmGmUm GmAmGmCmUm	345	AmsGfsCmUmCmAfCmU mGmUmGmCmAmUfGmC fCmAmUmsAmsUm
TRD007351	313	GmsCmsAmUmGfCmAf CfAfGmUmGmAmGmC mUmAmUmAm	346	UmsAfsUmAmGmCfUmC mAmCmUmGmUmGfCmA fUmGmCmsCmsAm
TRD007352	314	AmsUmsGmCmAfCmAf GfUfGmAmGmCmUmA mUmGmGmAm	347	UmsCfsCmAmUmAfGmC mUmCmAmCmUmGfUmG fCmAmUmsGmsCm
TRD007353	315	UmsGmsCmAmCfAmGf UfGfAmGmCmUmAmU mGmGmGmAm	348	UmsCfsCmCmAmUfAmG mCmUmCmAmCmUfGmU fGmCmAmsUmsGm
TRD007354	316	CmsAmsGmUmGfAmG fCfUfAmUmGmGmGm GmCmGmUmAm	349	UmsAfsCmGmCmCfCmC mAmUmAmGmCmUfCmA fCmUmGmsUmsGm
TRD0269	317	UmsGmsGmCmAfUmG fCfAfCmAmGmUmGm AmGmCmUmAm	350	UmsAfsGmCmUmCfAmC mUmGmUmGmCmAfUmG fCmCmAmsUmsAm
TRD0270	318	GmsGmsCmAmUfGmCf AfCfAmGmUmGmAmG mCmUmAmUm	351	AmsUfsAmGmCmUfCmA mCmUmGmUmGmCfAmU fGmCmCmsAmsUm

TRD007566	319	AmsAmsGmGmAfUmC fUfUfAmUmGmAmCm CmUmGmCmAm	352	UmsGfsCmAmGmGfUmC mAmUmAmAmGmAfUmC fCmUmUmsGmsCm
TRD007567	320	AmsGmsGmAmUfCmU fUfAfUmGmAmCmCm UmGmCmAmAm	353	UmsUfsGmCmAmGfGmU mCmAmUmAmAmGfAmU fCmCmUmsUmsGm
TRD007568	321	GmsGmsAmUmCfUmU fAfUfGmAmCmCmUm GmCmAmGmAm	354	UmsCfsUmGmCmAfGmG mUmCmAmUmAmAfGmA fUmCmCmsUmsUm
TRD007657	322	UmsUmsUmCmUfCmCf UfUfGmGmUmCmUmA mAmGmUmAm	355	UmsAfsCmUmUmAfGmA mCmCmAmAmGmGfAmG fAmAmAmsCmsGm
TRD007658	323	UmsUmsCmUmCfCmUf UfGfGmUmCmUmAmA mGmUmGmUm	356	AmsCfsAmCmUmUfAmG mAmCmCmAmAmGfGmA fGmAmAmsAmsCm
TRD007659	324	UmsCmsUmCmCfUmUf GfGfUmCmUmAmAmG mUmGmUmAm	357	UmsAfsCmAmCmUfUmA mGmAmCmCmAmAfGmG fAmGmAmsAmsAm
TRD0321	325	GmsCmsAmUmUfUmU fUfUfUmUmGmAmGm CmUmUmGmAm	358	UmsCfsAmAmGmCfUmC mAmAmAmAmAmAfAm AfUmGmCmsUmsGm
TJR100162	326	GmsCmsAmUmUfUmU fUfUfUmUmGmAmGm CmUmUmGmAm	359	UmsCmsAmAmGmCmUfC mAmAmAmAfAmAfAmA mUmGmCmsUmsGm
TJR100161	327	GmsCmsAmUmUfUmU fUfUfUmUmGmAmGm CmUmUmsGmsAm	360	UmsCmsAmAmGmCmUfC mAmAmAmAfAmAfAmA mUmGmCmsUmsGm
TJR100160	328	GmsCmsAmUmUfUmU fUfUfUmUmGmAmGm CmUmUmGmAmsAms Gm	361	UmsCmsAmAmGmCmUfC mAmAmAmAfAmAfAmA mUmGmCmsUmsGm
TJR100025	329	AmsUmsGmGmCmAm UfGmCfAfCfAmGmUm	362	AmsUfsAmGmCmUfCmAf CfUmGmUmGmCfAmUfG mCmCmAmUms AmsUm

		GmAmGmCmUmAmUm -L96		
TJR100189	330	AmsGmsCmCmGmUm UfUfCfUmCmCmUmU mGmGmUmCmUmAm Am-L96	363	UmsUfsAmGfAmCfCmAm AmGfGmAfGmAfAmAfC mGfGmCmUmsUmsUm
TJR100190	331	AmsGmsCmCmGmUm UfUfCfUmCmCmUmU mGmGmUmCmUmAm Am-L96	364	UmsUfsAmGfAmCfCmAm AmGfGmAfGmAfAmAfC mGfGmsCmsUm
TJR100191	332	GmsCmsCmGmUmUm UfCfUfCmCmUmUmG mGmUmCmUmAmAm Gm-L96	365	CmsUfsUmAfGmAfCmCm AmAfGmGfAmGfAmAfA mCfGmsGmsCm
TJR100192	333	GmsCmsCmGmUmUm UfCfUfCmCmUmUmG mGmUmCmUmAmAm Cm-L96	366	GmsUfsUmAfGmAfCmCm AmAfGmGfAmGfAmAfA mCfGmsGmsCm
TJR100193	334	GmsCmsCmGmUmUm UfCfUfCmCmUmUmG mGmUmCmUmAmAm Um-L96	367	AmsUfsUmAfGmAfCmCm AmAfGmGfAmGfAmAfA mCfGmsGmsCm
TJR100167	335	GmsUmsUmUmCmUm CfCfUfUmGmGmUmC mUmAmAmGmUm-L96	368	AmsCfsUmUfAmGfAmCm CmAfAmGfGmAfGmAfA mAfCm

Структура NAG0052 представляет собой:



Пример 15. Ингибирующая активность в отношении AGT в линии клеток гепатомы человека (Hep3B)

В клеточной линии гепатомы человека (Нер3В) проводили эксперимент с двойной дозой с конечными концентрациями дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперимент с однократной дозой проводили с конечной концентрацией дуплекса 0,1 нМ. Экспериментальные расходные материалы приведены в таблице 29.

За 24 часа до трансфекции клетки Нер3В наносили на 96-луночный планшет с концентрацией около 20000 клеток/лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды. Клетки трансфицировали образцами с использованием Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 10 нМ и 0,1 нМ. Через 24 часа после обработки общую клеточную РНК экстрагировали с использованием набора для высокопроизводительной клеточной экстракции РНК (FG0417-L/FG0418-XL, метод магнитных частиц) и проводили обратную транскрипцию РНК (набор для синтеза 1-й цепи кДНК Takara PrimeScript™ II (6210A)) и количественную детекцию PCR в реальном времени (набор для синтеза 1-й цепи кДНК Takara PrimeScript™ II (6210A)). Праймеры зонда Taqman показаны в таблице 30. Уровень мРНК AGT человека измеряли и корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH.

После того, как обнаружение Q-PCR зондом Taqman было завершено, соответствующие значения Ct были получены в соответствии с пороговым значением, автоматически установленным системой, и экспрессия определенного гена была относительно количественно оценена путем сравнения значений Ct: сравнение Ct относится к вычислению различий в экспрессии гена в соответствии с различиями от значения Ct внутреннего эталонного гена, а также упоминается как  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta\Delta Ct = [(ген-мишень экспериментальной группы Ct - внутренний эталон экспериментальной группы Ct) - (ген-мишень контрольной группы Ct - внутренний эталон контрольной группы Ct)]$ . Уровень ингибирования (%) =  $(1 - \text{остаточный уровень экспрессии целевого гена}) \times 100\%$ .

Таблица 29. Экспериментальные расходные материалы для скрининга активности клеток (экстрактор нуклеиновой кислоты)

Наименование	Компания	Номер по каталогу/модель
Lipofectamine RNAi Max	Invitrogen	13778-150
Реагенты Cells-to-CT Bulk Lysis	Thermo	4391851C
Набор для	FireGen	FG0417

высокопроизводительной экстракции клеточной РНК		
Набор для синтеза 1-й цепи кДНК PrimeScript™ II	Takara	6210B (A × 4)
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo	4444557

Таблица 30. Праймеры для зондов Taqman

Наименование праймера	Последовательность
hAGT-PF1-MGB	TGTGAGCAGCTGGCAAAGG (SEQ ID NO:425)
hAGT-PR1-MGB	GATGTCTTGGCCTGAATTGGA (SEQ ID NO:426)
hAGT-P1-MGB	CAATGCCGGGAAGC (SEQ ID NO:427)
hGAPDH-PF1-MGB	GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC (SEQ ID NO:428)
hGAPDH-PR1-MGB	TTGACGGTGCCATGGAATTT (SEQ ID NO:429)
hGAPDH-P1-MGB	TTACATGTTCCAATATGATTCC (SEQ ID NO:430)

Результаты выражены относительно оставшегося процента экспрессии мРНК AGT человека в клетках, обработанных контрольным образцом. Результаты скорости ингибирования IC<sub>50</sub> показаны в таблице 31.

Таблица 31. Ингибирующая активность в отношении AGT человека в клеточной линии гепатомы человека (Hep3B)

	Остаточный уровень экспрессии мРНК гена-мишени			
	10 нМ	SD (стандартное отклонение)	0,1 нМ	SD
TRD007716	14,2%	0,7%	24,0%	4,8%
TRD007343			105,4%	5,7%

TRD007344			102,2%	6,5%
TRD007345			85,4%	4,2%
TRD007346			78,1%	15,9%
TRD007347			101,5%	14,2%
TRD007348			106,4%	1,3%
TRD007349			100,3%	15,0%
TRD007350			91,5%	1,3%
TRD007351			99,3%	2,8%
TRD007352			96,0%	0,9%
TRD0269			104,5%	1,2%
TRD007353			90,0%	15,0%
TRD007354			81,4%	1,3%
TRD0270			106,7%	8,0%
TRD007770	19,0%	0,9%	29,9%	4,5%
TRD007657			100,3%	8,4%
TRD007658			166,4%	18,7%
TRD007659			111,7%	10,4%
TRD007751	118,0%	3,4%	126,8%	15,4%
TRD007566			103,3%	1,9%
TRD007567			83,4%	12,9%
TRD007568			80,7%	1,9%

Из данных в таблице 31 можно увидеть, что:

При низких концентрациях 0,1 нМ TRD007716 проявлял значительно лучшую активность в ингибировании пролиферации AGT, чем TRD007343, TRD007344, TRD007345, TRD007346, TRD007347, TRD007348, TRD007349, TRD007350, TRD007351, TRD007352, TRD007353, TRD007354, TRD0269 и TRD0270. Исходную последовательность из 14 последовательностей получали путем смещения исходной последовательности TRD007716, то есть TJR100299, на  $n$  оснований влево или вправо, и модификации были одинаковыми.

При низких концентрациях 0,1 нМ TRD007770 проявлял значительно лучшую активность в ингибировании пролиферации AGT, чем TRD007657, TRD007658 и TRD007659. Исходную последовательность из 3 последовательностей получали путем

смещения исходной последовательности TRD007770, то есть TJR100283, на  $n$  оснований влево или вправо, и модификации были одинаковыми.

Приведенные выше результаты показывают, что последовательности, полученные из TJR100299 и TJR100283, сами по себе обладают превосходной ингибирующей экспрессию активностью в отношении AGT.

Пример 16. Ингибирование AGT в линии клеток гепатомы человека (Hep3B) - Ингибирующая активность в нескольких точках концентрации

Эксперимент с дозозависимостью проводили в клеточной линии гепатомы человека (Hep3B) с использованием 7 градиентов концентрации.

За 24 часа до трансфекции клетки Hep3B наносили на 96-луночный планшет с концентрацией около 20000 клеток/лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды. Клетки трансфицировали с помощью образцов с использованием Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 и 0,00064 нМ. Через 24 часа после обработки экстрагировали общую клеточную РНК с использованием набора для высокопроизводительной клеточной экстракции РНК и проводили обратную транскрипцию РНК и количественную детекцию PCR в реальном времени. Уровень мРНК человека измеряли, и уровень мРНК AGT человека корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH.

Результаты выражены относительно оставшегося процента экспрессии мРНК AGT человека в клетках, обработанных контрольным образцом. Результаты скорости ингибирования  $IC_{50}$  показаны в таблице 32. Была сделана ссылка на экспериментальную процедуру в Примере 15.

Таблица 32. Ингибирующая активность в отношении AGT человека в клетках Hep3B

Образец №	Оставшийся процент экспрессии мРНК (Hep3B) гена-мишени (среднее значение)							Hep3B $IC_{50}$ (нМ)
	10	2,0	0,4	0,08	0,016	0,0032	0,00064	
TRD0077 16	19,12%	14,22%	12,95%	35,90%	77,55%	103,03%	113,12%	0,040 6

TRD0077 70	16,5%	8,9%	14,0%	31,1%	67,6%	96,4%	113,7%	0,030 2
TRD0079 20	16,1%	16,0%	22,2%	45,8%	90,2%	113,8%	118,5%	0,066 8
TRD0079 25	23,4%	32,2%	40,1%	73,2%	97,9%	111,1%	116,4%	0,245 5
TRD0080 29	8,80%	17,19%	15,74%	28,34%	79,22%	105,53%	103,22%	0,036 3
TJR1000 23	12,18%	22,03%	47,90%	70,13%	106,02%	115,36%	107,98%	0,291 1
TJR1000 24	12,25%	18,66%	31,11%	46,67%	97,55%	96,31%	103,30%	0,078 4
TJR1000 25	17,38%	36,16%	68,71%	95,80%	110,63%	104,47%	104,63%	0,909 7
TJR1001 89	20,85%	27,64%	46,21%	75,05%	83,00%	95,33%	100,00%	0,331 1
TJR1001 90	19,74%	28,81%	50,88%	77,82%	99,64%	94,97%	100,00%	0,389 0
TJR1001 91	24,71%	54,04%	81,89%	88,12%	79,19%	100,03%	100,00%	3,104 6
TJR1001 92	19,67%	67,60%	100,26%	112,63%	113,00%	112,45%	100,00%	3,235 9
TJR1001 93	13,04%	36,98%	79,89%	107,30%	116,21%	123,19%	100,00%	1,158 8
TJR1001 01	11,75%	15,93%	22,13%	36,53%	62,79%	88,16%	100,00%	0,034 4
TJR1001 02	12,73%	16,91%	23,44%	35,16%	67,80%	94,77%	100,00%	0,037 2
TJR1001 04	10,96%	17,53%	22,87%	40,82%	72,71%	96,48%	100,00%	0,050 5
TJR1001 67	15,21%	26,24%	35,54%	66,47%	105,99%	110,78%	100,00%	0,160 3

TJR1002 83	7,0%	12,1%	14,8%	24,5%	48,4%	105,3%	104,9%	0,016 3
TJR1002 86	8,7%	12,5%	15,5%	25,5%	58,4%	110,6%	109,0%	0,021 4
TJR1002 90	10,8%	18,2%	23,1%	35,0%	61,7%	92,3%	115,0%	0,032 5
TJR1002 91	41,9%	57,1%	70,4%	102,3%	119,6%	125,9%	122,5%	2,710 2
TJR1002 92	11,5%	15,8%	19,0%	31,3%	62,8%	96,9%	105,1%	0,028 6
TJR1002 93	10,1%	16,3%	24,2%	40,2%	68,9%	92,9%	109,9%	0,044 7
TJR1002 99	13,4%	13,7%	18,6%	31,6%	57,8%	85,7%	94,3%	0,026 3
TJR1003 02	14,2%	16,2%	23,6%	39,4%	71,5%	102,3%	97,8%	0,044 7
TJR1003 03	16,5%	20,0%	33,7%	56,3%	87,6%	118,2%	104,2%	0,108 1
TJR1003 04	44,9%	55,3%	69,3%	94,7%	106,0%	119,0%	105,5%	3,020 0
TJR1003 05	79,2%	88,1%	93,8%	106,8%	104,5%	110,0%	105,9%	>10
TJR1003 06	21,4%	30,4%	42,8%	65,8%	87,2%	102,7%	103,0%	0,234 4
TJR1003 07	108,6%	123,8%	115,2%	111,5%	111,4%	107,8%	104,9%	>10
TJR1003 08	21,7%	25,1%	34,0%	61,7%	88,4%	106,7%	105,9%	0,141 3
TJR1003 09	21,9%	24,5%	33,2%	57,0%	89,1%	103,7%	104,5%	0,138 0
TJR1003 10	22,9%	23,8%	30,3%	59,6%	80,6%	102,1%	101,8%	0,112 2

TJR1003 11	14,6%	19,2%	27,5%	47,7%	73,1%	90,0%	93,4%	0,069 2
TJR1003 12	64,5%	85,3%	92,8%	95,8%	93,2%	97,2%	98,9%	>10
TJR1003 13	32,9%	38,8%	57,1%	76,9%	90,0%	93,5%	94,3%	0,660 7
TJR1003 20	30,8%	36,5%	49,8%	75,4%	93,3%	88,3%	85,8%	0,378 4
TJR1003 22	32,0%	42,3%	61,4%	87,6%	108,1%	119,1%	104,1%	0,794 3
TJR1003 23	97,2%	108,2%	116,5%	129,4%	127,2%	131,0%	118,4%	>10
TJR1003 24	48,0%	62,2%	76,3%	100,6%	115,2%	117,2%	109,7%	>10
TJR1003 25	69,3%	78,5%	93,1%	108,9%	110,0%	124,1%	105,8%	>10
TJR1003 26	50,2%	62,8%	85,5%	99,3%	112,9%	107,9%	100,7%	>10
TJR1003 27	78,8%	86,6%	93,9%	106,2%	108,2%	104,8%	88,9%	>10
TJR1003 28	54,4%	74,0%	89,7%	97,0%	110,4%	108,7%	88,3%	>10

Из данных в таблице 32 можно увидеть, что:

Ингибирующая активность TRD007716, TRD007925, TJR100023, TJR100024 и TJR100104 в отношении AGT лучше, чем у TJR100025; ингибирующая активность TRD008029, TRD007920, TRD007770, TJR100101 и TJR100102 в отношении AGT лучше, чем у TJR100189, TJR100190, TJR100191, TJR100192, TJR100193 и TJR100167. Результаты показывают, что последовательности с различными модификациями, полученные из исходных последовательностей TJR100283 и TJR100299, демонстрируют лучшую ингибирующую активность, чем контрольная последовательность.

Ингибирующая активность TJR100283 в отношении AGT лучше, чем у TJR100286, TJR100290, TJR100291, TJR100292 и TJR100293; ингибирующая активность TJR100299 в отношении AGT значительно лучше, чем у TJR100302, TJR100303, TJR100304, TJR100305,

TJR100306, TJR100307, TJR100308, TJR100309, TJR100310, TJR100311, TJR100312 и TJR100313; ингибирующая активность TJR100320 в отношении AGT значительно лучше, чем у TJR100322, TJR100323, TJR100324, TJR100325, TJR100326, TJR100327 и TJR100328. Последовательности этих образцов получали из трех последовательностей TJR100283, TJR100299 и TJR100320 путем мутации первого основания на 5'-конце, смещения оснований влево или вправо и тому подобное. Результаты показывают, что 3 последовательности сами по себе, а именно TJR100283, TJR100299 и TJR100320, демонстрируют лучшую ингибирующую активность в отношении AGT, и что все изменения оснований ослабляют ингибирующую активность в отношении AGT.

#### Пример 17. Проверка целевых уровней psiCHECK

Образцы подвергали *in vitro* моделированию на молекулярном уровне скрининга нецелевого уровня в клетках НЕК 293А с использованием 11 градиентов концентрации. Результаты эксперимента приведены в таблице 34.

Для последовательностей образцов были сконструированы соответствующие целевые последовательности. То есть, целевые плазмиды (GSCM) целевых последовательностей образца конструировали и вставляли в плазмиды psiCHECK. Плазмиды содержали ген люциферазы рениллы и ген люциферазы светлячка. Плазмиды представляли собой системы двойного репортерного гена. Активность образцов для целевой последовательности отражалась измерениями экспрессии люциферазы рениллы, скорректированной люциферазой светлячка. В измерении использовалась система анализа репортера двойной люциферазы (Promega, E2940).

Клетки НЕК 293А культивировали при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> в среде с высоким содержанием глюкозы DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. За 24 часа до трансфекции клетки НЕК 293А инокулировали на 96-луночный планшет с плотностью 8000 клеток на лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды.

Клетки совместно трансфицировали образцы и соответствующими плазмидами с использованием Lipofectamine2000 (ThermoFisher, 11668019) в соответствии с инструкциями. Для каждой лунки использовали 0,2 мкл Lipofectamine2000. Количество трансфекции плазмиды составляло 10 нг на лунку. Для плазмид нецелевой последовательности было установлено в общей сложности 11 точек концентрации для образцов, причем самая высокая конечная концентрация в точке концентрации составляла 20 нМ. Проводили 3-кратное серийное разведение, в результате чего получали 20 нМ, 6,667 нМ, 2,222 нМ, 0,741 нМ, 0,247 нМ, 0,082 нМ, 0,0274 нМ, 0,0091 нМ, 0,0030 нМ, 0,001 нМ и 0,0003 нМ. Протокол разведения образцов с несколькими точками концентрации показан в

таблице 33. Через 24 часа после трансфекции уровни, нецелевые уровни определяли с использованием аналитической системы двойной репортерной люциферазы (Promega, E2940). Расчет относительного значения: соотношение = REN/FIR; расчет скорости ингибирования:  $1 - (\text{соотношение} + \text{миРНК}/\text{только репортерный ген}) \times 100\% = \text{скорость ингибирования} (\%)$ .

Таблица 33. Протокол разведения нескольких концентраций

Концентрация миРНК (нМ)	Конечная концентрация (нМ)	Добавление воды и миРНК
20000	20	
20	6,667	4 мкл миРНК + 36 мкл H <sub>2</sub> O
6,667	2,222	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
2,222	0,741	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,741	0,247	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,247	0,082	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,082	0,0274	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0274	0,0091	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0091	0,0030	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0030	0,0010	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O
0,0010	0,0003	10 мкл миРНК + 20 мкл H <sub>2</sub> O

Таблица 34. Результаты скрининга целевой активности psiCHECK - ингибирующая активность в 11 точках концентрации

№	Оставшийся процент экспрессии мРНК целевого гена (GSCM) (среднее значение)					
	20 нМ	6,667 нМ	2,222 нМ	0,741 нМ	0,247 нМ	0,082 нМ
TJR100019	81,6%	52,7%	36,3%	34,1%	46,6%	69,3%
TJR100024	16,6%	14,9%	15,0%	15,5%	22,3%	32,7%
TJR100025	26,6%	24,1%	25,4%	26,8%	32,7%	62,7%
TJR100072	13,9%	12,2%	12,9%	12,9%	17,6%	25,1%
TRD008029	29,5%	20,0%	17,6%	17,5%	17,3%	25,3%
TJR100053	14,5%	13,2%	15,9%	15,5%	14,8%	20,6%
TRD008096-1	21,7%	18,4%	14,0%	14,7%	14,1%	19,2%

TJR100103	14,7%	16,6%	13,0%	14,1%	23,8%	31,6%
TJR100104	14,8%	13,4%	13,1%	14,6%	18,4%	29,0%
TJR100101	19,3%	18,8%	18,4%	18,1%	18,3%	24,2%
TJR100102	16,0%	12,9%	16,6%	15,9%	15,5%	19,5%
TJR100160	21,5%	14,1%	14,4%	20,3%	41,1%	68,4%
TJR100161	18,1%	13,2%	11,7%	15,3%	26,8%	48,1%
TJR100162	22,5%	13,9%	11,6%	15,4%	27,6%	50,9%
TRD0321	19,8%	9,1%	8,1%	12,7%	25,4%	48,0%
№	Оставшийся процент экспрессии мРНК гена-мишени (среднее значение)					GSCM IC <sub>50</sub> (нМ)
	0,027 нМ	0,009 нМ	0,003 нМ	0,001 нМ	0,0003 нМ	
TJR100019	100,3%	117,2%	127,7%	135,3%	120,6%	0,1932
TJR100024	52,8%	84,1%	111,0%	104,5%	87,9%	0,0344
TJR100025	91,6%	111,4%	124,8%	126,8%	104,0%	0,1132
TJR100072	42,8%	63,6%	89,1%	101,8%	75,8%	0,0195
TRD008029	39,5%	80,7%	105,0%	102,9%	90,6%	0,0201
TJR100053	39,1%	66,7%	89,7%	100,2%	96,5%	0,0171
TRD008096-1	29,6%	50,6%	77,0%	99,0%	84,1%	0,0096
TJR100103	51,5%	84,3%	107,3%	100,0%		0,0314
TJR100104	45,1%	76,8%	93,3%	99,0%	102,3%	0,0244
TJR100101	42,2%	71,6%	87,6%	93,3%	94,0%	0,0195
TJR100102	34,9%	62,5%	86,5%	94,2%	94,6%	0,0141
TJR100160	83,1%	93,3%	96,7%	98,0%	92,6%	0,1660
TJR100161	72,2%	87,9%	89,0%	84,0%	87,4%	0,0748
TJR100162	71,1%	91,6%	86,6%	94,3%	90,5%	0,0794
TRD0321	72,5%	94,8%	97,6%	106,9%	100,4%	0,0703

Из данных видно, что:

Ингибирующая активность TRD008029, TJR100053, TJR100101, TJR100102 и TRD008096-1 в отношении AGT лучше, чем у TJR100160, TJR100161, TJR100162 и TRD0321. Это указывает на то, что различные дцРНК или конъюгаты миРНК, полученные из исходной последовательности TJR100283, демонстрируют лучшую ингибирующую активность, чем контрольная последовательность.

Ингибирующая активность TJR100024, TJR100072, TJR100103 и TJR100104 в отношении AGT лучше, чем у TJR100025. Это указывает на то, что различные дцРНК или конъюгаты миРНК, полученные из исходной последовательности TJR100299, демонстрируют лучшую ингибирующую активность.

#### Пример 18. Проверка с помощью psiCHECK нецелевых уровней цепей AS и SS

In vitro моделирование на молекулярном уровне скрининга нецелевого уровня проводили на клетках НЕК 293А с использованием 11 градиентов концентрации. Результаты эксперимента приведены в таблице 35.

Правила конструирования соответствующих целевых плазмид заключаются в следующем:

Разработка нецелевых последовательностей для цепи AS каждого образца. То есть были сконструированы нецелевые плазмиды (GSSM), которые полностью комплементарны 5'-концевым положениям 1-8 антисмысловых цепей и основания которых в других положениях вообще не совпадают. Соответствующие правила для несовпадений оснований заключались в том, что пары А с С и пары G с Т. Для улучшения чувствительности обнаружения были сконструированы нецелевые плазмиды GSSM-5hits, в которых 5 идентичных последовательностей GSSM были соединены с помощью TTCC и вставлены в плазмиды psiCHECK; плазмиды содержали ген люциферазы рениллы и ген люциферазы светлячка. Плазмиды представляли собой системы двойного репортерного гена. Целевую последовательность вставляли в область 3'UTR (3'-нетранслируемая область) гена люциферазы рениллы.

Для смысловых цепей были сконструированы нецелевые плазмиды (PSCM), которые полностью комплементарны цепям SS. Были сконструированы нецелевые плазмиды (PSSM), которые полностью комплементарны положениям 1-8 5'-конца смысловых цепей и основания которых в других положениях вообще не совпадают. Соответствующие правила для несовпадений оснований заключались в том, что пары А с С и пары G с Т. Для улучшения чувствительности обнаружения были сконструированы нецелевые плазмиды PSSM-5hits, в которых 5 идентичных последовательностей PSSM были соединены с помощью TTCC.

Активность для целевой последовательности отражалась измерениями экспрессии люциферазы рениллы, скорректированной люциферазой светлячка. В измерении использовалась система анализа двойной репортерной люциферазы (Promega, E2940). Остальную часть экспериментальной процедуры см. в Примере 17.

Таблица 35. Результаты скрининга нецелевой активности psiCHECK смысловой и антисмысловой цепей

№	IC <sub>50</sub> (нМ)		
	Нецелевая активность затравочной области AS цепи	Нецелевая активность полноразмерной SS цепи	Нецелевая активность затравочной области SS цепи
TJR100100	>20	>20	>20
TJR100101	>20	>20	>20
TJR100103	>20	>20	>20
TRD007920	>20	>20	>20

Результаты показывают, что перечисленные образцы не связаны или связаны с минимальным нецелевым риском.

Пример 19. Ингибирование AGT в линии клеток гепатомы человека (Huh7) - Ингибирующая активность в нескольких точках концентрации

МиРНК подвергали эксперименту с дозозависимостью в клеточной линии гепатомы человека (Huh7) с использованием 7 градиентов концентрации.

За 24 часа до трансфекции клетки Huh7 наносили на 96-луночный планшет с концентрацией около 20000 клеток/лунку, причем каждая лунка содержала 100 мкл среды. Клетки трансфицировали образцами с использованием Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 и 0,00064 нМ. Через 24 часа после обработки экстрагировали общую клеточную РНК с использованием набора для высокопроизводительной клеточной экстракции РНК и проводили обратную транскрипцию РНК и количественную детекцию PCR в реальном времени. Уровень мРНК человека измеряли, и уровень мРНК AGT человека корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH.

Результаты выражены относительно оставшегося процента экспрессии мРНК AGT человека в клетках, обработанных контрольным образцом. Результаты скорости ингибирования IC<sub>50</sub> показаны в таблице 36. Была сделана ссылка на экспериментальную процедуру в Примере 12.

Таблица 36. Ингибирующая активность 7-концентраций в отношении AGT

## человека в клетках Huh7

Образец №	Оставшийся процент экспрессии мРНК (Huh7) гена-мишени (среднее значение)							Huh7 IC <sub>50</sub> (нМ)
	10	2,0	0,4	0,08	0,016	0,0032	0,00064	
TRD007920	9,34 %	11,58 %	23,53%	53,89 %	84,07%	98,77%	98,43%	0,1122
TRD008096	15,4 %	14,1%	28,6%	60,2%	88,2%	103,6%	100,0%	0,1204
TJR100053	14,8 %	11,9%	20,5%	44,9%	79,8%	93,8%	100,0%	0,0615
TJR100189	18,9 %	32,3%	57,3%	81,0%	100,6%	97,5%	100,0%	0,5960
TJR100190	18,3 %	37,2%	59,5%	101,4 %	106,4%	101,2%	100,0%	0,6430
TJR100191	24,6 %	57,0%	83,5%	96,1%	88,1%	94,4%	100,0%	2,7100
TJR100192	15,3 %	63,8%	86,7%	104,5 %	106,5%	99,0%	100,0%	3,1770
TJR100193	13,1 %	41,7%	78,9%	102,8 %	111,3%	109,6%	100,0%	1,3590

В Huh7 ингибирующая активность трех последовательностей TRD007920, TRD008096 и TJR100053 в отношении мРНК AGT лучше, чем у TJR100189, TJR100190, TJR100191, TJR100192 и TJR100193.

Пример 20 Ингибирующая активность в отношении AGT в первичных гепатоцитах человека (PHH)

Эксперименты с дозозависимостью проводили в первичных гепатоцитах человека (PHH) с использованием 8 градиентов концентрации и 7 градиентов концентрации.

Клетки трансфицировали образцами с использованием Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 20, 6,67, 2,22, 0,74, 0,25, 0,082, 0,027 и 0,009 нМ. Для другой группы использовались градиентные концентрации: 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 и 0,00064 нМ. Равные объемы RNAiMAX и образца, разбавленного Opti-MEM

I, смешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем добавляли в 96-луночный планшет при 10 мкл/луночку, и затем добавляли суспензию размороженных замороженных РНН (6,7Е5 клеток/мл) при 90 мкл/луночку. Клетки собирали через 24 часа после трансфекции, и общую клеточную РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen-74182). Добавляли случайный праймер, следуя инструкциям в наборе для обратной транскрипции (Tiangen, KR106), для обратной транскрипции РНК в кДНК. Уровни мРНК AGT в образцах измеряли с помощью qPCR (количественная PCR), и уровни мРНК AGT человека корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH.

Уровень экспрессии целевой мРНК AGT для каждого образца рассчитывали с помощью относительного метода количественного определения  $\Delta\Delta Ct$ . Относительный уровень экспрессии целевого гена представлен  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , и формула расчета выглядит следующим образом:

$\Delta Ct$  = среднее значение  $Ct$  гена-мишени - среднее значение  $Ct$  внутреннего эталонного гена;

$\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  (группа добавления лекарственного средства) -  $\Delta Ct$  (контрольная группа);

Относительный уровень экспрессии мРНК гена-мишени  $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$

$IC_{50}$  рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (логистическое уравнение с четырьмя параметрами). Результаты представлены в таблице 37.

Таблица 37. Ингибирующая активность в отношении AGT в РНН

№ образца	Скорость ингибирования экспрессии мРНК (РНН) гена-мишени (среднее значение)								РНН $IC_{50}$ (нМ)
	20 нМ	6,667 нМ	2,222 нМ	0,741 нМ	0,247 нМ	0,082 нМ	0,027 нМ	0,009 нМ	
TRD007716	69,9 %	69,7%	62,9%	62,7%	51,3%	38,1%	25,9%	14,4 %	0,0652
№ образца	Скорость ингибирования экспрессии мРНК (РНН) гена-мишени (среднее значение)								РНН $IC_{50}$ (нМ)
	10 нМ	2,0 нМ	0,4 нМ	0,08 нМ	0,016 нМ	0,0032 нМ	0,0006 нМ	4 нМ	
TJR1000	19,1	24,2%	32,0%	57,8%	83,0%	101,1%	111,1%		0,113

99	%								7
TJR1001 00	19,4 %	19,8%	37,3%	71,6%	91,0%	98,7%	91,5%		0,210 0
TJR1001 01	20,3 %	21,5%	32,9%	56,8%	81,2%	98,9%	103,8%		0,110 8
TJR1001 02	17,4 %	20,5%	25,4%	43,9%	68,1%	92,0%	91,4%		0,052 5
TJR1001 03	13,5 %	14,9%	29,6%	54,5%	86,7%	93,1%	95,0%		0,108 0
TJR1001 04	12,8 %	10,7%	12,8%	20,1%	51,7%	83,4%	100,0%		0,015 4

Все последовательности демонстрируют хорошую ингибирующую активность в отношении мРНК AGT в РНН.

Пример 21. Ингибирование AGT в первичных гепатоцитах обезьян (PCH) - Ингибирующая активность в нескольких точках концентрации

Образцы подвергали эксперименту с дозозависимостью в первичных гепатоцитах обезьян (PCH) с использованием 7 градиентов концентрации.

Клетки трансфицировали образцами с использованием Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, 13778150), следуя инструкции по применению продукта, при этом конечные концентрации образцов для трансфекции составляли 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 и 0,00064 нМ. Равные объемы RNAiMAX и образца, разбавленного Opti-MEM I, смешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем добавляли в 96-луночный планшет при 10 мкл/лунку, и затем добавляли суспензию размороженных замороженных PCH (6,7E5 клеток/мл) при 90 мкл/лунку. Клетки собирали через 24 часа после трансфекции, и общую клеточную РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen-74182). Добавляли случайный праймер, следуя инструкциям в наборе для обратной транскрипции (Tiangen, KR106), для обратной транскрипции РНК в кДНК. Уровни мРНК AGT в образцах измеряли с помощью qPCR (количественная PCR), и уровни мРНК AGT обезьяны корректировали на основе уровня внутреннего эталонного гена GAPDH. Последовательности праймера зонда показаны в таблице 38.

Уровень экспрессии целевой мРНК AGT для каждого образца рассчитывали с помощью относительного метода количественного определения  $\Delta\Delta Ct$ . Относительный уровень экспрессии целевого гена представлен  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , и формула расчета выглядит следующим образом:

$\Delta CT$  = среднее значение  $C_t$  гена-мишени - среднее значение  $C_t$  внутреннего эталонного гена;

$\Delta\Delta CT$  =  $\Delta CT$  (группа добавления лекарственного средства) -  $\Delta CT$  (контрольная группа);

Относительный уровень экспрессии мРНК гена-мишени  $= 2^{-\Delta\Delta CT}$

$IC_{50}$  рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (логистическое уравнение с четырьмя параметрами). Результаты представлены в таблице 39.

Таблица 38. Праймеры для зондов Taqman

Наименование праймера	Последовательность
mkAGT-PF1-MGB	AAAGCAGTCGTTTCTCCTTGGT (SEQ ID NO:419)
mkAGT-PR1-MGB	CCTGGGAGGCGCATTG (SEQ ID NO:420)
mkAGT-P1-MGB	CTGCGTGAGCAGTAAG (SEQ ID NO:421)
mkGAPDH-PF1-MGB	AGTCAGCCGCATTTTCTCTTG (SEQ ID NO:422)
mkGAPDH-PR1-MGB	AAATCCGTTGACTCCGACCTT (SEQ ID NO:423)
mkGAPDH-P1-MGB	ATCGCCAGCGCATC (SEQ ID NO:424)

Таблица 39. Ингибирующая активность 7-концентраций в отношении AGT обезьян в РСН

Образец №	Оставшийся процент экспрессии мРНК (РСН) гена-мишени (среднее значение)							РСН $IC_{50}$ (нМ)
	10	2,0	0,4	0,08	0,016	0,0032	0,00064	
TJR100099	8,8%	20,3%	31,3%	55,6%	102,0%	106,5%	109,4%	0,1166
TJR100104	7,6%	18,7%	27,8%	37,2%	63,5%	86,9%	100,0%	0,0404
TJR100167	19,6%	22,4%	31,5%	46,0%	75,0%	96,8%	102,4%	0,0668
TJR100101	4,7%	16,2%	21,4%	32,6%	51,2%	91,6%	93,1%	0,0243
TJR100102	4,2%	18,7%	25,8%	34,0%	49,7%	86,1%	113,1%	0,0229
TRD008096	6,4%	22,1%	29,2%	39,7%	64,3%	109,8%	112,7%	0,0437
TJR100053	3,8%	17,5%	24,3%	32,8%	46,4%	84,6%	99,1%	0,0214
TJR100283	18,2%	20,4%	22,0%	25,6%	33,8%	61,5%	90,6%	0,0060

TJR100292	17,9%	22,4%	26,6%	34,7%	51,5%	82,9%	105,8%	0,0209
TJR100293	19,7%	27,9%	43,8%	67,7%	104,0%	117,3%	111,5%	0,2213
TJR100295	17,9%	24,5%	27,0%	31,1%	45,9%	75,1%	99,2%	0,0135

Первые 7 последовательностей продемонстрировали превосходную ингибирующую активность в отношении AGT в PCH, и активность TJR100283 значительно лучше, чем у TJR100292, TJR100293 и TJR100295. Это указывает на то, что последовательность TJR100283 сама по себе или ее конъюгаты или дцРНК демонстрируют очень сильную ингибирующую активность в отношении AGT.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. МиРНК, содержащая смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где

смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6;

антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12;

миРНК нацеливается на ангиотензиноген.

2. МиРНК по п. 1, где

смысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6;

антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12;

предпочтительно, смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6;

предпочтительно, антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12.

3. МиРНК по п. 1 или 2, содержащая или выбранная из любой из следующих групп:

группа 1) смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 7;

группа 2) смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 2, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 8;

группа 3) смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 3, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 9;

группа 4) смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 4, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 10;

группа 5) смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 5, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 11;

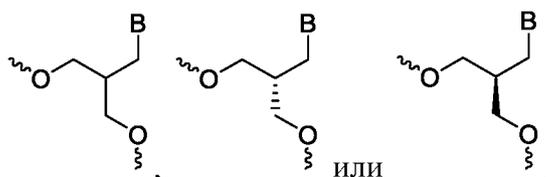
группа 6) смысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 6, и антисмысловая цепь, представленная в SEQ ID NO: 12.

4. МиРНК по любому из пп. 1-3, где по меньшей мере один нуклеотид в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи представляет собой модифицированный нуклеотид.

5. МиРНК по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один нуклеотид в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой модифицированный нуклеотид, где:

- модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, или

- модифицированный нуклеотид содержит химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию, причем химическая модификация формулы (I) выбрана из группы, состоящей из:



каждый В независимо выбран из группы, состоящей из оснований, соответствующих положениям 2-8 5'-конца антисмысловой цепи.

6. МиРНК по любому из пп. 1-5, где нуклеотид в положении 5, 6 или 7 5'-конца антисмысловой цепи

- представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, или

- содержит химическую модификацию формулы (I) или ее таутомерную модификацию, как определено в п. 5;

когда химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация находится в положении 5 5'-конца, В представляет собой основание в положении 5 5'-конца антисмысловой цепи;

когда химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация находится в положении 6 5'-конца, В представляет собой основание в положении 6 5'-конца антисмысловой цепи;

когда химическая модификация формулы (I) или ее таутомерная модификация находится в положении 7 5'-конца, В представляет собой основание в положении 7 5'-конца антисмысловой цепи.

7. МиРНК по любому из пп. 1-6, где три смежных нуклеотида в смысловой цепи представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и/или

в направлении от 5'-конца к 3'-концу, каждый из нуклеотидов в положениях 2, 4, 6, 9, 12, 14, 16 и 18 антисмысловой цепи независимо представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; или

в направлении от 5'-конца к 3'-концу каждый из нуклеотидов в положениях 2, 4, 6, 10, 12, 14, 16 и 18 антисмысловой цепи независимо представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

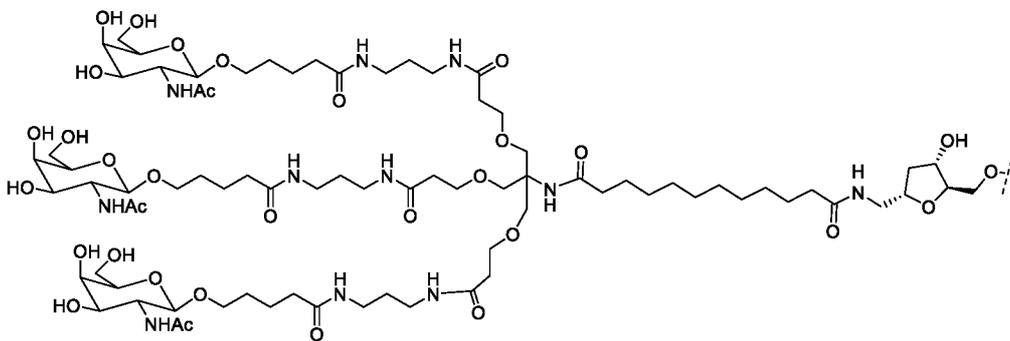


каждый нацеливающий фрагмент независимо выбран из группы, состоящей из: галактозы, галактозамина, N-формил-галактозамина, N-ацетил-галактозамина, N-пропионил-галактозамина, N-n-бутирил-галактозамина и N-изобутирил-галактозамина;

предпочтительно, нацеливающий фрагмент представляет собой N-ацетил-галактозамин;

более предпочтительно, нацеливающий лиганд содержит три идентичных или различных нацеливающих фрагмента.

15. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота по п. 14, где нацеливающий лиганд представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, где формула (II) представляет собой:



16. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота, содержащая смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 163 - SEQ ID NO: 188; антисмысловая цепь выбрана из любой из SEQ ID NO: 217 - SEQ ID NO: 242; предпочтительно, двухцепочечная рибонуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из TRD008096, TJR100053 или TJR100296.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая:

миРНК по любому из пп. 1-12 или двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту по любому из пп. 13-16 и

фармацевтически приемлемый носитель.

18. Способ ингибирования экспрессии гена ангиотензиногена, включающий введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы:

миРНК по любому из пп. 1-12, или

двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 13-16, или

фармацевтической композиции по п. 17.

19. Способ лечения и/или предотвращения заболевания, включающий введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы миРНК по любому из пп. 1-12, или двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 13-16 или

фармацевтической композиции по п. 17;

где предпочтительно заболевание представляет собой гипертонию.

20. Способ доставки миРНК или двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты в печень *in vivo*, где:

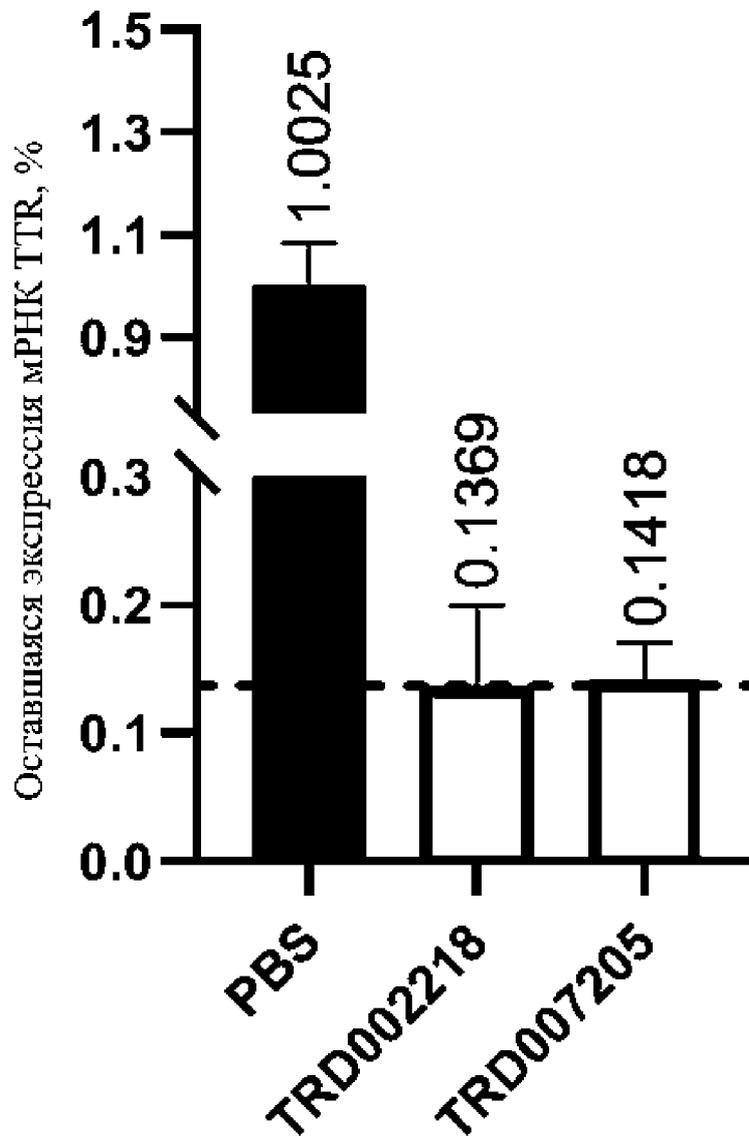
миРНК или двухцепочечная рибонуклеиновая кислота ингибирует экспрессию и/или репликацию гена ангиотензиногена, и

способ включает введение субъекту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 13-16 или фармацевтической композиции по п. 17.

21. Способ получения миРНК или двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты, включающий:

синтезирование миРНК по любому из пп. 1-12 или двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 13-16.

Оставшийся уровень экспрессии  
мРНК целевого гена – седьмой день

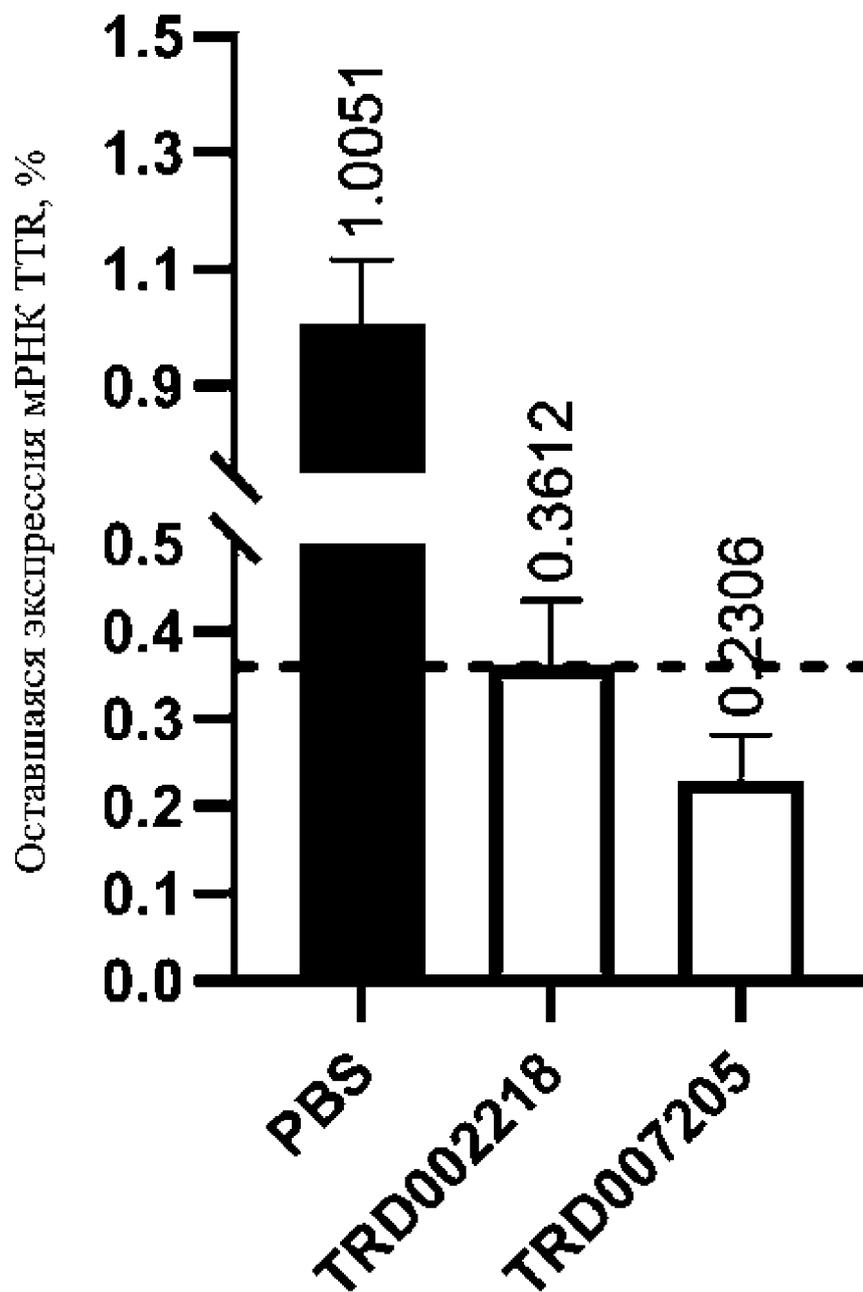


TTR - ген белка транстиретина

PBS - фосфатно-солевой буферный раствор

Фиг. 1

Оставшийся уровень экспрессии  
мРНК целевого гена - день 28



Фиг. 2