

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491242 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.23(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.11.15

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА АНГИОТЕНЗИНОГЕНА (AGT)

(31) PCT/CN2021/130832;
PCT/CN2022/081578(72) Изобретатель:
Шу Дунсюй (CN), Шао Пэнчэн
Патрик (US)

(32) 2021.11.16; 2022.03.18

(33) CN

(86) PCT/CN2022/131861

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2023/088227 2023.05.25

(71) Заявитель:
ШАНХАЙ АРГО
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(CN)

(57) Представлены композиция и способ для подавления экспрессии белка ангиотензиногена (AGT). В частности, представлены композиция и способ, которые можно применять для снижения экспрессии гена AGT и лечения заболеваний и нарушений, связанных с AGT. Представлены реагент на основе AGT-специфической dsRNA, который можно применять для снижения экспрессии AGT в клетке и объекте, реагент на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, композиция, содержащая реагент на основе AGT-специфической dsRNA, и композиция, содержащая реагент на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида.



A1

202491242

202491242

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581082EA/032

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА АНГИОТЕНЗИНОГЕНА (AGT)

Область техники

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к композициям и способам, применимым для подавления экспрессии белка ангиотензиногена (AGT).

Предпосылки изобретения

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (RAAS) играет ключевую роль в регуляции артериального давления. Каскад RAAS начинается с секреции ренина в кровообращение юкстагломерулярными клетками почек. Секреция ренина стимулируется несколькими факторами, в том числе нагрузкой Na^+ в дистальных канальцах, бета-симпатической стимуляцией и/или снижением перфузии почек. Активный ренин в плазме крови расщепляет ангиотензиноген (вырабатываемый печенью) до ангиотензина I, который впоследствии преобразуется в ангиотензин II циркулирующим и локально экспрессированным ангиотензин-превращающим ферментом (ACE). Большинство эффектов ангиотензина II в отношении RAAS проявляется посредством его связывания с рецептором ангиотензина II типа 1 (AT1R), что приводит к артериальной вазоконстрикции, тубулярным и гломерулярным эффектам, таким как усиленная регуляция реабсорбции Na^+ или скорость гломерулярной фильтрации. Далее, вместе с другими стимулами (такими как кортикотропин, антидиуретический гормон, катехоламины, эндотелин и серотонин), а также с уровнем Mg^{2+} и K^+ , стимуляция AT1R приводит к высвобождению альдостерона, который впоследствии способствует экскреции Na^+ и K^+ в дистальных канальцах.

Дисрегуляция RAAS, приводящая, например, к чрезмерной выработке ангиотензина II и/или стимуляции AT1R, вызывает гипертензию, которая может привести, например, к усилению окислительного стресса, развитию воспаления, гипертрофии и фиброза в сердце, почках и артериях, а также, например, к фиброзу левого желудочка, артериальному ремоделированию и гломерулосклерозу.

Гипертензия представляет собой наиболее распространенное поддающееся контролю заболевание в развитых странах, которым страдает 20-50% взрослого населения. Гипертензия является основным фактором риска развития целого ряда заболеваний, нарушений и состояний, таких как сокращение продолжительности жизни, хроническое заболевание почек, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризма (например, аневризма аорты), заболевание периферических артерий, повреждение сердца (например, дилатация или гипертрофия сердца) и другие связанные с сердечно-сосудистой системой заболевания, нарушения и/или состояния. Дополнительно было доказано, что гипертензия является важным фактором риска, влияющим на частоту возникновения заболеваний сердечно-сосудистой системы и смертность вследствие таковых, являясь первопричиной 62% всех инсультов и 49% всех сердечных заболеваний. В 2017 году в

рекомендации по диагностике, предупреждению и лечению гипертензии были внесены изменения, согласно которым целевые показатели артериального давления стали еще ниже, с тем чтобы дополнительно снизить риск развития заболеваний и нарушений, связанных с гипертензией (см. например, Reboussin et al., Systematic Review for the 2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.*, 7 ноября 2017 г., pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004; и Whelton et al. (2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.*, 7 ноября 2017 г., pii:S0735-1097(17)41519-1. doi:10.1016/j.jacc.2017.11.006).

Несмотря на большое количество антигипертензивных лекарственных средств, доступных для лечения гипертензии, более чем у двух третей людей состояние не может контролироваться одним антигипертензивным лекарственным средством, и требуется два или больше антигипертензивных лекарственных средств, выбранных из разных классов средств. Это еще больше снижает количество субъектов с контролируемым артериальным давлением вследствие снижения соблюдения режима приема лекарственных средств и усиления побочных эффектов, возникающих при более частом их применении.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в альтернативных и комбинированных средствах терапии для лечения гипертензии и других заболеваний, связанных с ангиотензиногеном.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, представлен реагент на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии ангиотензиногена (AGT), при этом указанный реагент на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, положения нуклеотидов от 2 до 18 в антисмысловой нити содержат область комплементарности РНК-транскрипту AGT, где область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из антисмысловых последовательностей, перечисленных в таблицах 1-4, и необязательно содержит нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности РНК-транскрипта AGT содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 смежных нуклеотидов, которые отличаются не более чем 3 нуклеотидами от одной из антисмысловых последовательностей, перечисленных в таблицах 1-4. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить dsRNA по меньшей мере по сути комплементарна любой области-мишени SEQ ID NO: 519 и представлена в одной из таблиц 1-4. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить dsRNA полностью комплементарна любой области-мишени SEQ ID NO: 519 и представлена в одной из таблиц 1-4. В некоторых вариантах осуществления

средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей смысловой нити, перечисленных в таблицах 1-4, где последовательность смысловой нити по меньшей мере по сути комплементарна последовательности антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей смысловой нити, перечисленных в таблицах 1-4, при этом последовательность смысловой нити полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей антисмысловой нити, перечисленных в таблицах 1-4. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей, перечисленных в качестве последовательностей дуплекса в таблицах 1-4.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить, которая отличается 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от формулы (A): 5'-Z₁AGCUUGUUUGUGAAACZ₂-3', где Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 0-15 нуклеотидов, и Z₂ выбрана из одного из A, U, C, G или отсутствует. В определенных вариантах осуществления Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 1-4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления Z₂ представляет собой A. В определенных вариантах осуществления Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотив CACC или GACC. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₁ выбрана из одного из следующих мотивов: C, AC, UC, GC, CC, ACC, UCC, GCC, CCC, GACC, AACC, UACC, CACC, CGACC, CCGACC, ACCGACC, AACCGACC, CAACCGACC, CCAACCGACC, UCCAACCGACC, AUCCAACCGACC, AAUCCAACCGACC или GAAUCCAACCGACC. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит антисмысловую нить, которая отличается 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от формулы (B): 5'-Z₃GUUUCACAAACAAGCUZ₄-3', где Z₃ выбрана из одного из A, U, C, G или отсутствует, и Z₄ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 0-15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления Z₄ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 1-4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления Z₄ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления Z₃ представляет собой U. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₄ выбрана из нуклеотидных последовательностей, содержащих мотив GGUC или GGUG. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₄ выбрана из одного из следующих мотивов: G, GU, GC, GA, GG, GGU, GGA, GGC, GGG, GGUG, GGUC, GGUU, GGUA, GGUCG, GGUCGG, GGUCGGU, GGUCGGUU, GGUCGGUUG, GGUCGGUUGG,

GGUCGGUUGGA, GGUCGGUUGGAA, GGUCGGUUGGAAU, GGUCGGUUGGAAUU или GGUCGGUUGGAAUUC. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, при этом смысловая и антисмысловая нить соответственно содержат нуклеотидные последовательности, отличающиеся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от формулы (A) и формулы (B), как описано в данном документе, и необязательно содержат нацеливающий лиганд. В определенных вариантах осуществления длина каждой из смысловой нити (A) и антисмысловой нити (B) средства на основе dsRNA составляет не более 35 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z_1 и Z_4 полностью или частично комплементарны. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить, которая отличается 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от формулы (A'): 5'- Z_1 'CAGCUUGUUUGUGAAACA-3', и содержит антисмысловую нить, которая отличается 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от формулы (B'): 5'-UGUUUCACAAACAAGCUG Z_4 '-3', где каждая из Z_1 ' и Z_4 ' независимо предусматривает нуклеотидную последовательность, состоящую из мотивов из 0-13 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления каждая из Z_1 ' и Z_4 ' независимо содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из мотивов из 1, 2 или 3 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z_1 ' выбрана из одного из следующих мотивов: A, U, G, C, AC, UC, GC, CC, GAC, AAC, UAC, CAC, CGAC, CCGAC, ACCGAC, AACCGAC, CAACCGAC или GAAUCCAACCGAC. Нуклеотидная последовательность Z_4 ' выбрана из одного из следующих мотивов: U, C, A, G, GU, GA, GC, GG, GUG, GUC, GUU, GUA, GUCG, GUCGG, GUCGGU, GUCGGUU, GUCGGUUG или GUCGGUUGGAAUUC.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из антисмысловых последовательностей, перечисленных ниже:

- 5'-UACUCAUUAGAAGAAAGGUG-3' (SEQ ID NO: 162);
- 5'-UCUUAGACCAAGGAGAAACGG-3' (SEQ ID NO: 163);
- 5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUC-3' (SEQ ID NO: 167);
- 5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUG-3' (SEQ ID NO: 523);
- 5'-UUCGGUUGGAAUUCUUUUUGC-3' (SEQ ID NO: 184);
- 5'-GUUUCACAAACAAGCUGG-3' (SEQ ID NO: 653).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, каждая из которых содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из нуклеотидных последовательностей, перечисленных ниже:

- смысловая нить: 5'-CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA-3' (SEQ ID NO: 65),
- антисмысловая нить: 5'-UACUCAUUAGAAGAAAAGGUG-3' (SEQ ID NO: 162).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, каждая из которых содержит по меньшей мере 15

смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из нуклеотидных последовательностей, перечисленных ниже:

смысловая нить: 5'-CCGUUUCUCCUUGGUCUAAGA-3' (SEQ ID NO: 66),

антисмысловая нить: 5'-UCUUAGACCAAGGAGAAACGG-3' (SEQ ID NO: 163).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, каждая из которых содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из нуклеотидных последовательностей, перечисленных ниже:

смысловая нить: 5'-GACCAGCUUGUUUGUGAAACA-3' (SEQ ID NO: 70),

антисмысловая нить: 5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUC-3' (SEQ ID NO: 167).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, каждая из которых содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из нуклеотидных последовательностей, перечисленных ниже:

смысловая нить: 5'-CACCAGCUUGUUUGUGAAACA-3' (SEQ ID NO: 522),

антисмысловая нить: 5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUC-3' (SEQ ID NO: 523).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, каждая из которых содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из нуклеотидных последовательностей, перечисленных ниже:

смысловая нить: 5'-GCAAAAAGAAUUCCAACCGAA-3' (SEQ ID NO: 87),

антисмысловая нить: 5'-UUCGGUUGGAAUUCUUUUUGC-3' (SEQ ID NO: 184).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, каждая из которых содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из нуклеотидных последовательностей, перечисленных ниже:

смысловая нить: 5'-CCAGCUUGUUUGUGAAAC-3' (SEQ ID NO: 652),

антисмысловая нить: 5'-GUUUCACAAACAAGCUGG-3' (SEQ ID NO: 653).

В некоторых вариантах осуществления дуплекс средства на основе dsRNA выбран из любого дуплекса из AD00158-19-2, AD00158-19-1, AD00158-3, AD00158-1, AD00158-2, AD00158, AD00159, AD00159-1, AD00159-2, AD00159-19-1, AD00159-19-2, AD00163, AD00163-1, AD00163-2, AD00163-19-1, AD00163-19-2, AD00163-3, AD00300-1, AD00300-19-1 и AD00300-19-2 в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления дуплекс средства на основе dsRNA выбран из любого дуплекса из AV01227, AV01228, AV01229, AV01230, AV01231, AV01232, AV01233, AV01234, AV01235, AV01236, AV01237, AV01238, AV01239, AV01240, AV01241, AV01242, AV01243, AV01244, AV01245, AV01246, AV01247, AV01248, AV01249, AV01250, AV01251, AV01252, AV01253, AV01254, AV01255, AV01256, AV01257 или AV01711 в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по

меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В определенных вариантах осуществления все или по сути все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает: 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'3'-секонуклеотидные миметики, замкнутые нуклеотиды, нуклеотиды типа "незамкнутой нуклеиновой кислоты" (UNA), нуклеотиды типа "гликолевой нуклеиновой кислоты" (GNA), 2'-F-арабинонуклеотиды, 2'-метоксиэтилнуклеотиды, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, рибитол, инвертированные нуклеотиды, инвертированные нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями, инвертированные 2'-ОМе-нуклеотиды, инвертированные 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-аминомодифицированные нуклеотиды, 2'-алкиломодифицированные нуклеотиды, морфолинонуклеотиды и 3'-ОМе-нуклеотиды, нуклеотиды, содержащие 5'-фосфоротиоатную группу, или концевые нуклеотиды, соединенные с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-аминомодифицированные нуклеотиды, фосфорамидаты или нуклеотиды, содержащие неприродное основание.

В некоторых вариантах осуществления эти средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) содержат смысловую и антисмысловую нить, комплементарные по меньшей мере части мРНК, соответствующей гену-мишени, при этом средство на основе dsRNA содержит нуклеотидную последовательность, содержащую антисмысловую нить, представленную формулой (C), и нуклеотидную последовательность, содержащую смысловую нить, представленную формулой (D).

Антисмысловая нить предусматривает формулу (C), приведенную в направлении от 3'- к 5'-концу:



и смысловая нить предусматривает формулу (D), приведенную в направлении от 5'- к 3'-концу:



При этом каждый N_F представляет собой 2'-фтормодифицированный нуклеотид. N_{M1} , N_{M2} , N_{M3} , N_{M4} , N_{M5} , N_{M6} , N_{M7} и N_{M8} независимо представляют собой модифицированные или немодифицированные нуклеотиды. В N_{M1} , N_{M2} , N_{M3} , N_{M4} , N_{M5} , N_{M6} , N_{M7} и N_{M8} есть только три 2'-фтормодифицированных нуклеотида или только один 2'-фтормодифицированный нуклеотид. Каждый N_L независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, где такая модификация не является 2'-фтормодифицированным нуклеотидом. Каждый N'_F представляет собой 2'-фтормодифицированный нуклеотид. N'_{N1} , N'_{N2} , N'_{N3} , N'_{N4} , N'_{N5} и N'_{N6} независимо представляют собой модифицированные или немодифицированные нуклеотиды. В N'_{N1} , N'_{N2} , N'_{N3} , N'_{N4} , N'_{N5} и N'_{N6} есть только два 2'-фтормодифицированных нуклеотида. Каждый N'_L независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный

нуклеотид, где такая модификация не является 2'-фтормодифицированным нуклеотидом. Каждый n и n' может независимо представлять собой целое число от 0 до 7.

В определенных вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 7, 12, 14 и 16 (считая от первого парного нуклеотида на 5'-конце) антисмысловой нити, представленной формулой (C), в средстве на основе dsRNA представляют собой 2'-фтормодифицированные нуклеотиды; и нуклеотиды в положениях 9, 11 и 13 (считая от первого парного нуклеотида на 3'-конце) смысловой нити, представленной формулой (D), представляют собой 2'-фтормодифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления нуклеотиды в положениях N_{M2} , N_{M3} , N_{M6} антисмысловой нити, представленной формулой (C), представляют собой 2'-фтормодифицированные нуклеотиды, и нуклеотиды в положениях N'_{N3} , N'_{N5} смысловой нити, представленной формулой (D), представляют собой 2'-фтормодифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит Е-винилфосфонатный нуклеотид на 5'-конце направляющей нити. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей.

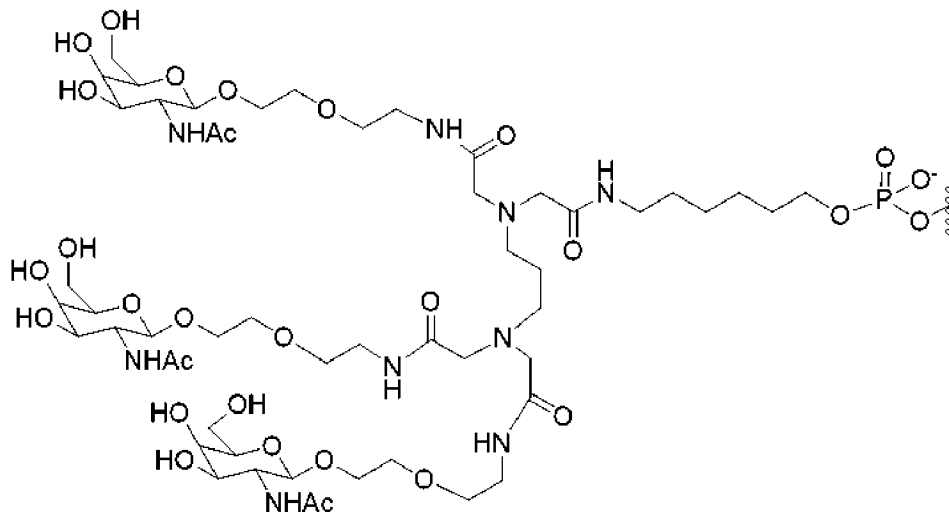
В определенных вариантах осуществления все или по сути все нуклеотиды смысловой и антисмысловой нитей являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная смысловая нить представляет собой модифицированную последовательность смысловой нити, представленную в таблицах 2-4. В некоторых вариантах осуществления модифицированная антисмысловая нить представляет собой модифицированную последовательность антисмысловой нити, представленную в таблицах 2-4.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить комплементарна или по сути комплементарна антисмысловой нити, и длина области комплементарности составляет от 16 до 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина области комплементарности составляет 19-21 нуклеотид. В определенных вариантах осуществления длина области комплементарности составляет 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

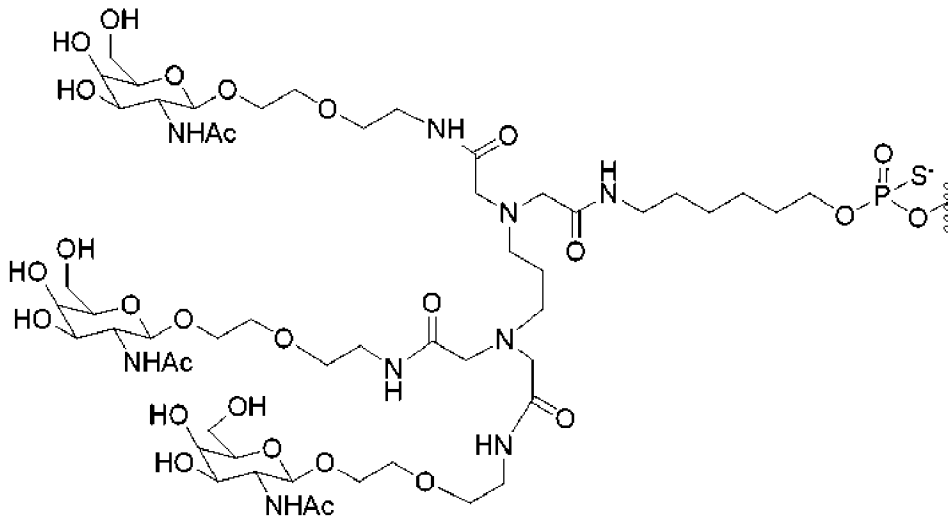
В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина

каждой нити составляет 4, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

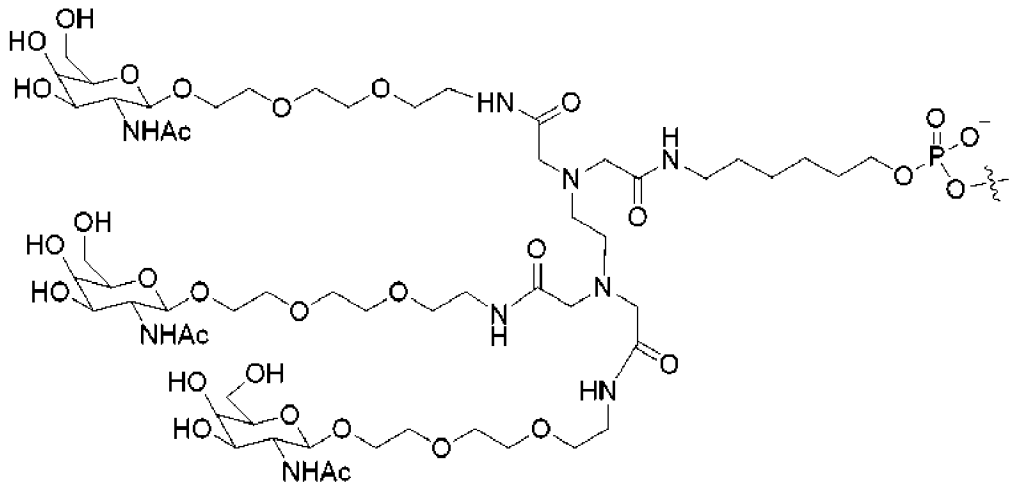
В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и дополнительно содержит одну или несколько нацеливающих или связывающих групп. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько нацеливающих групп или связывающих групп конъюгированы со смысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа или связывающая группа содержат N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа имеет следующую структуру:



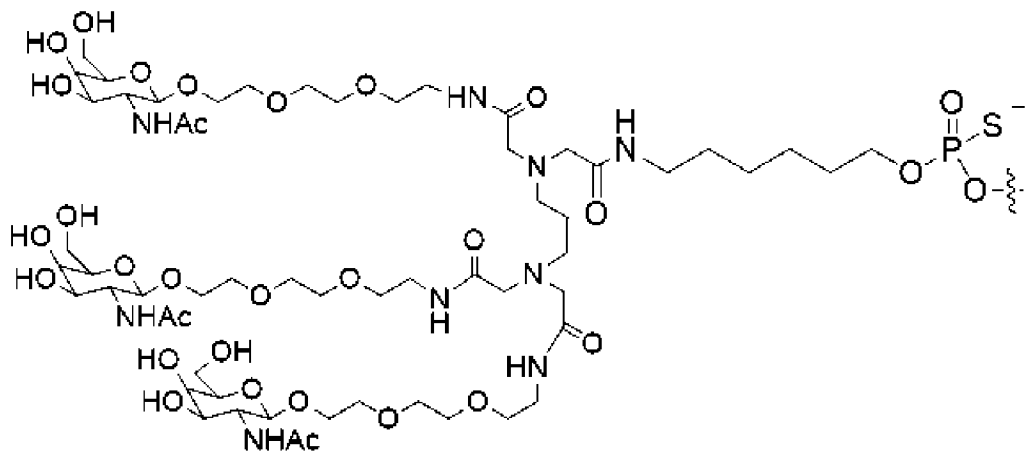
GLO-1,



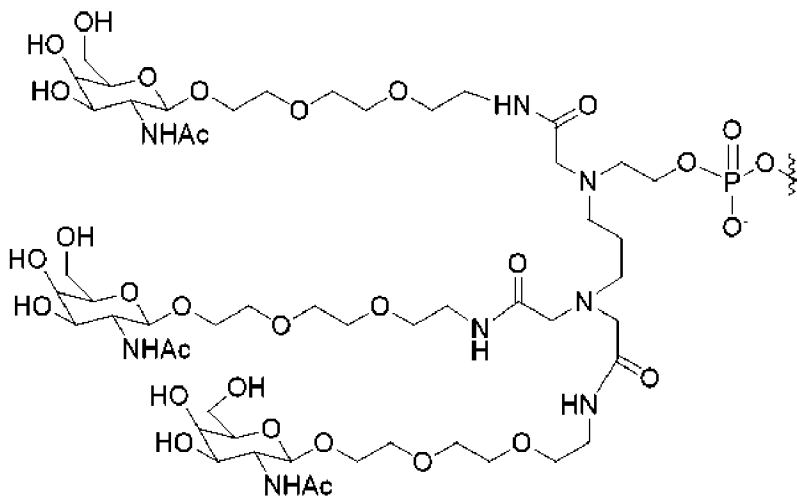
GLS-1,



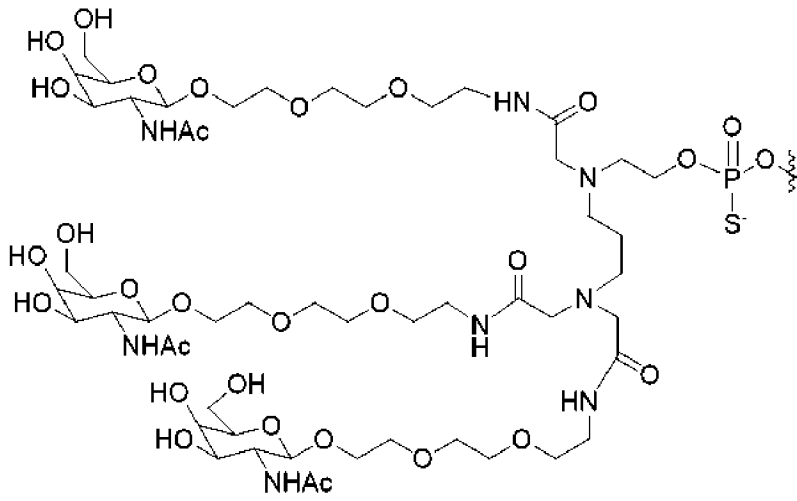
GLO-2,



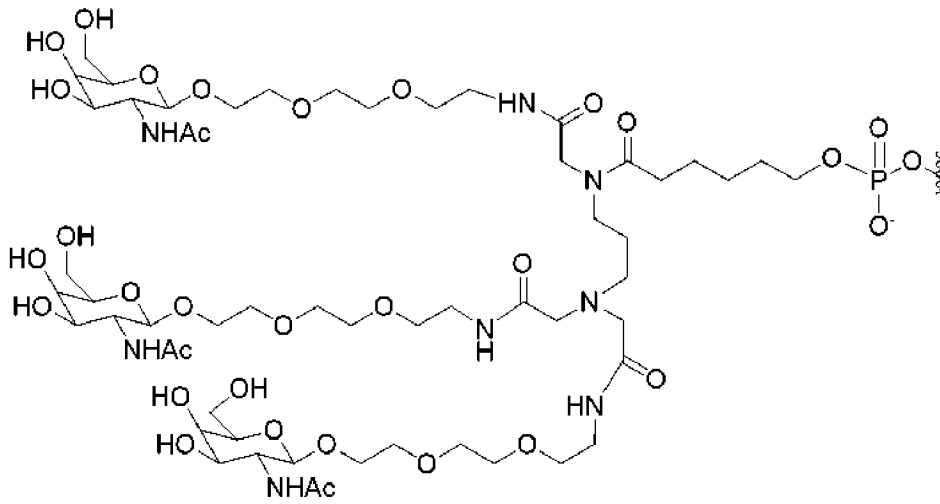
GLS-2,



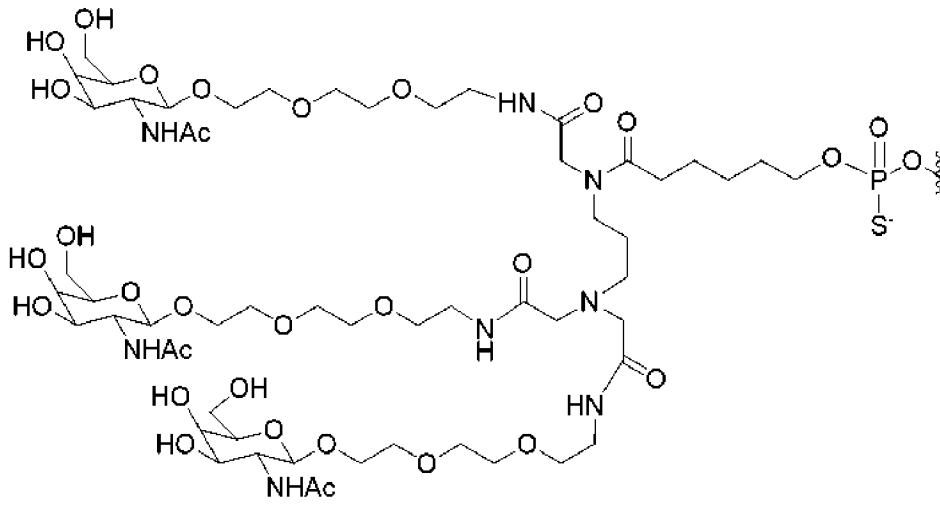
GLO-3



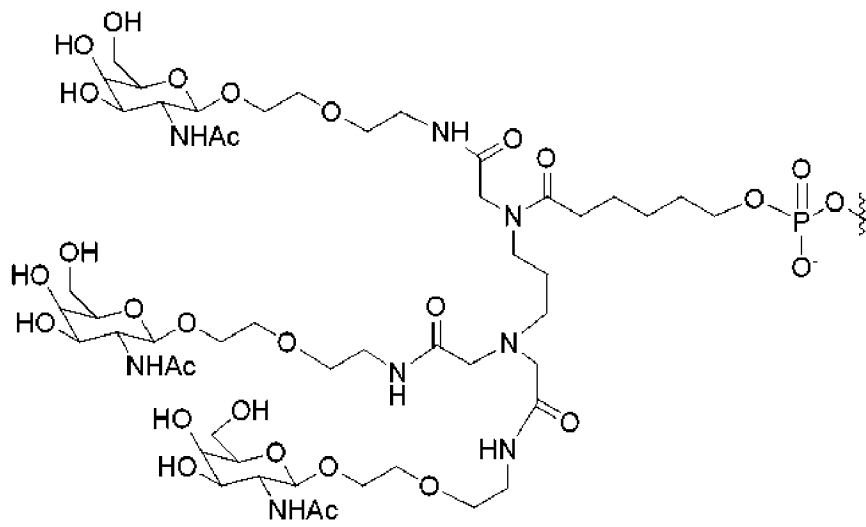
GLS-3,



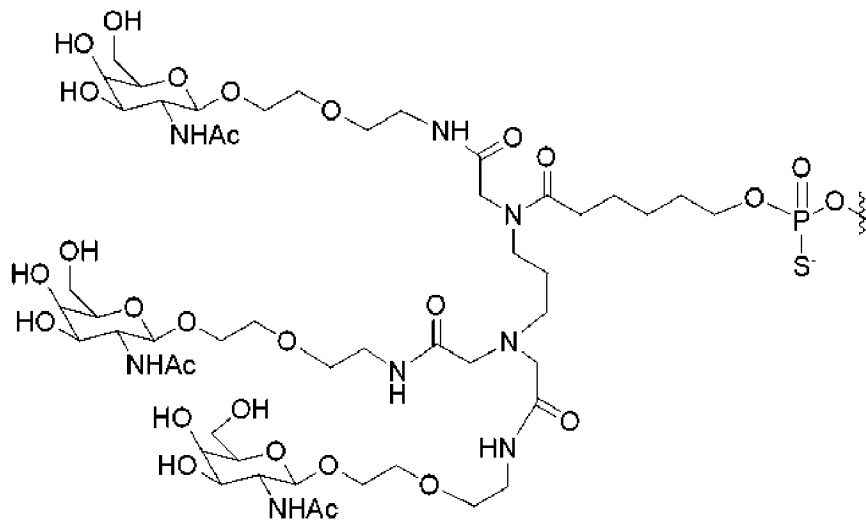
GLO-4,



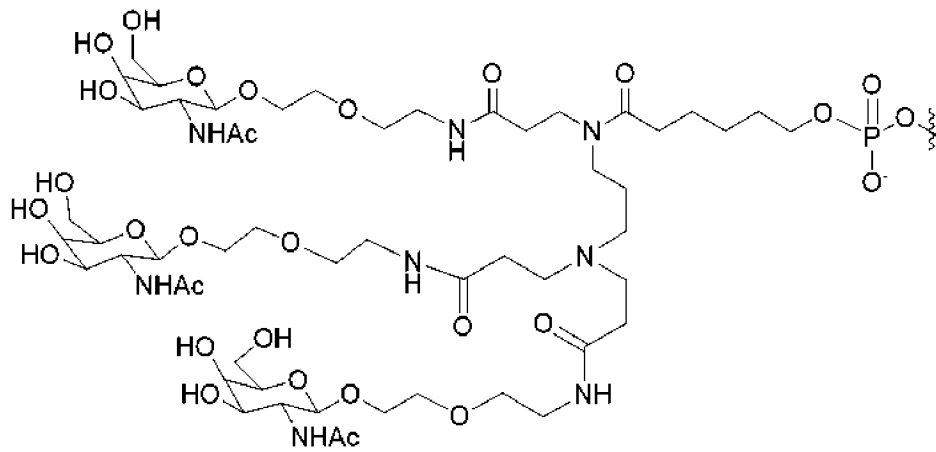
GLS-4,



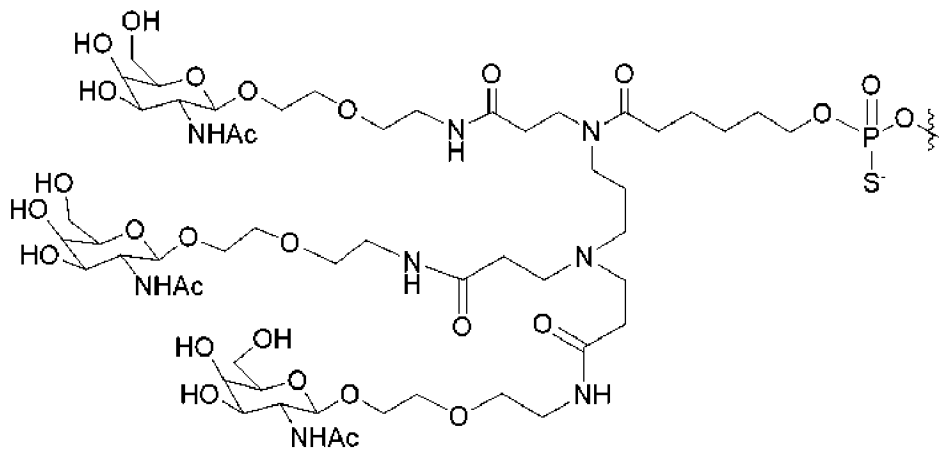
GLO-5,



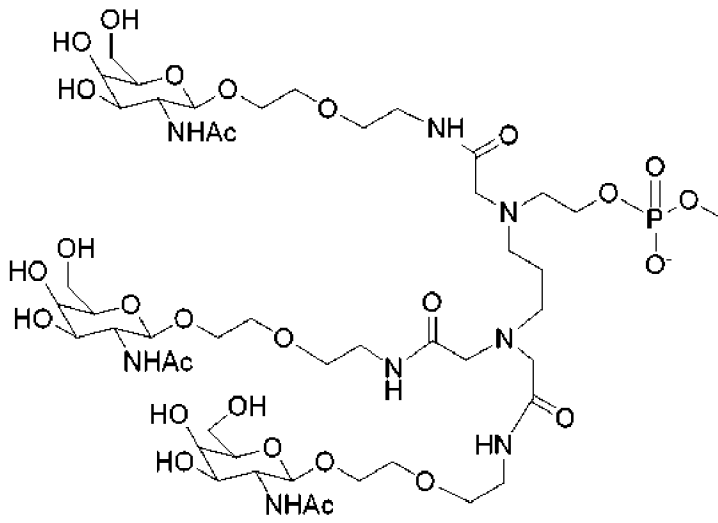
GLS-5,



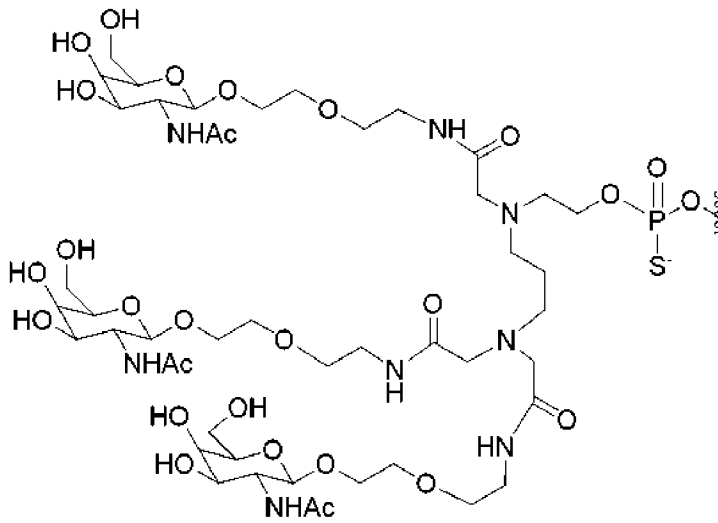
GLO-6,



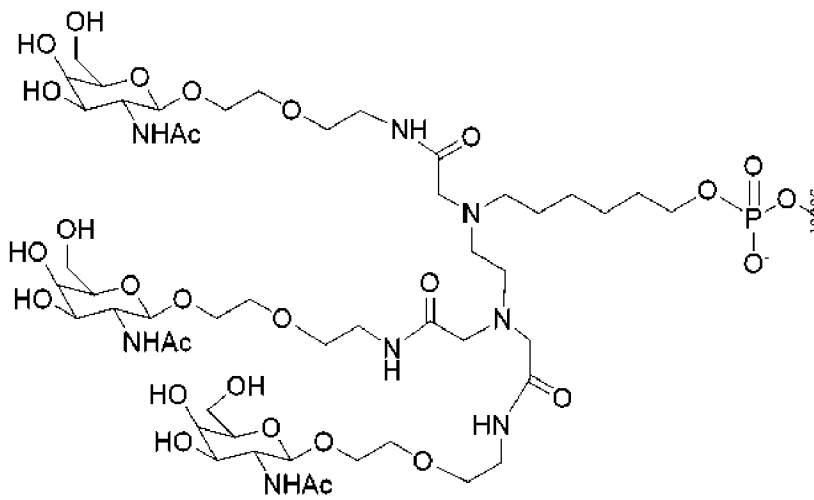
GLS-6,



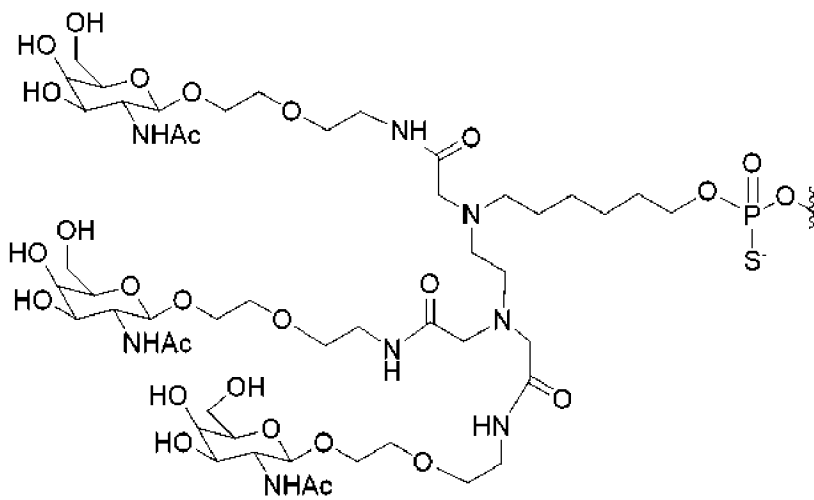
GLO-7,



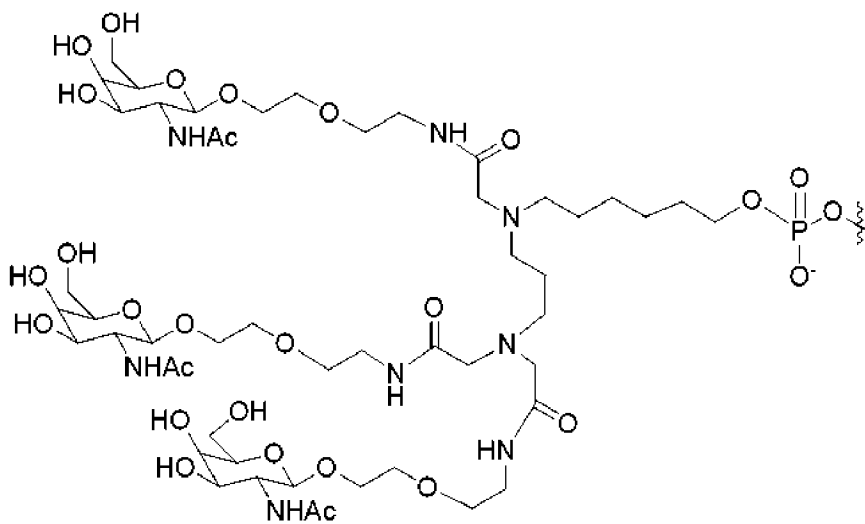
GLS-7,



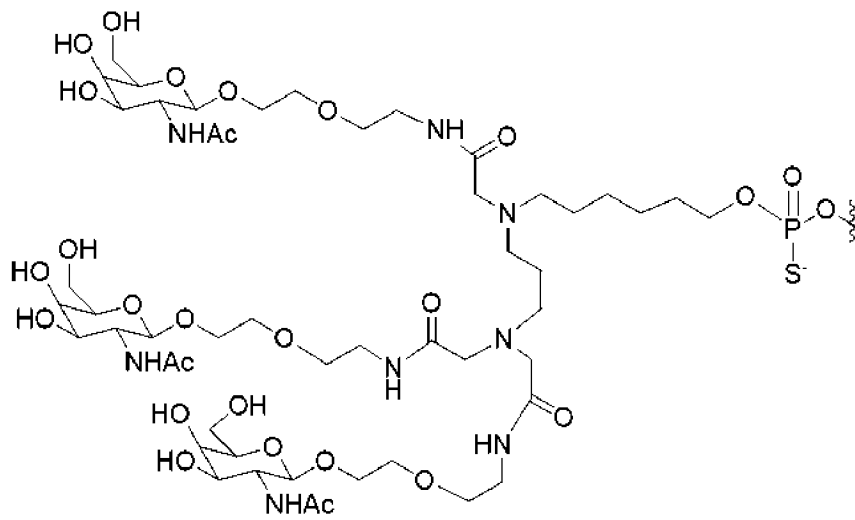
GLO-8,



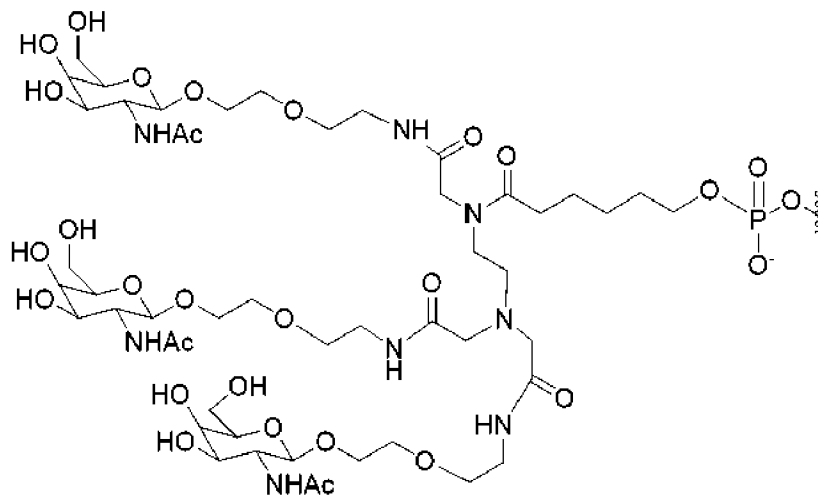
GLS-8,



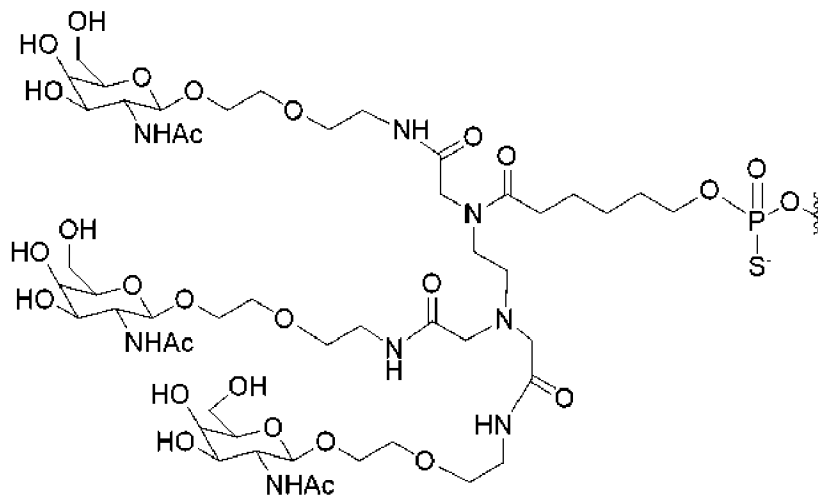
GLO-9,



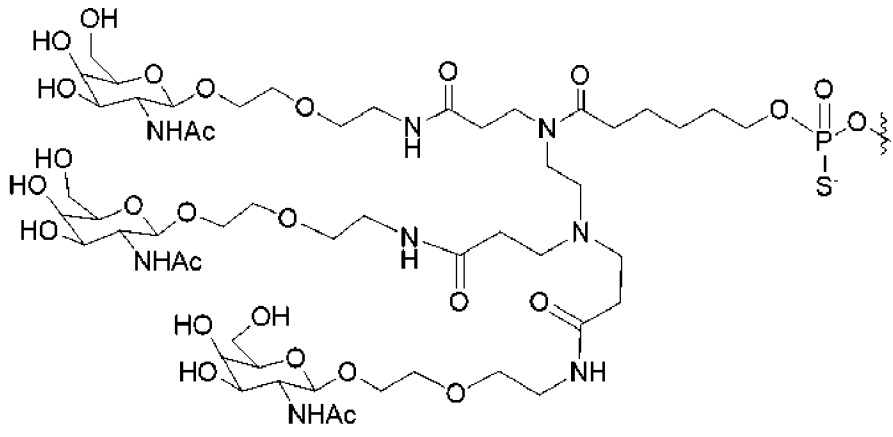
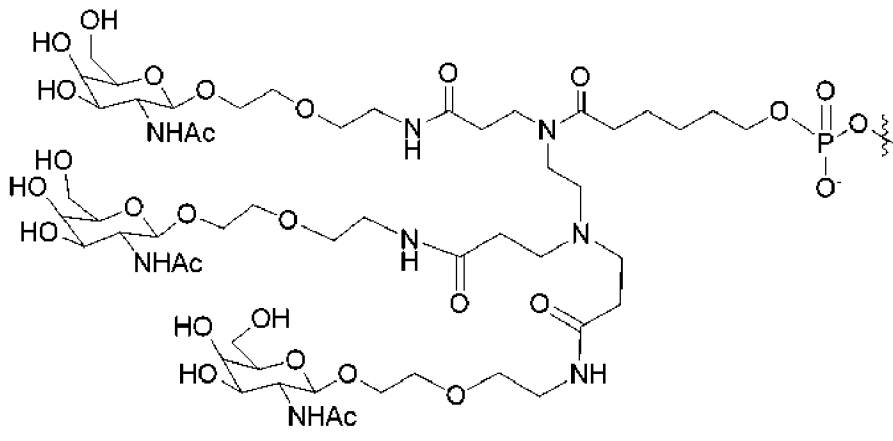
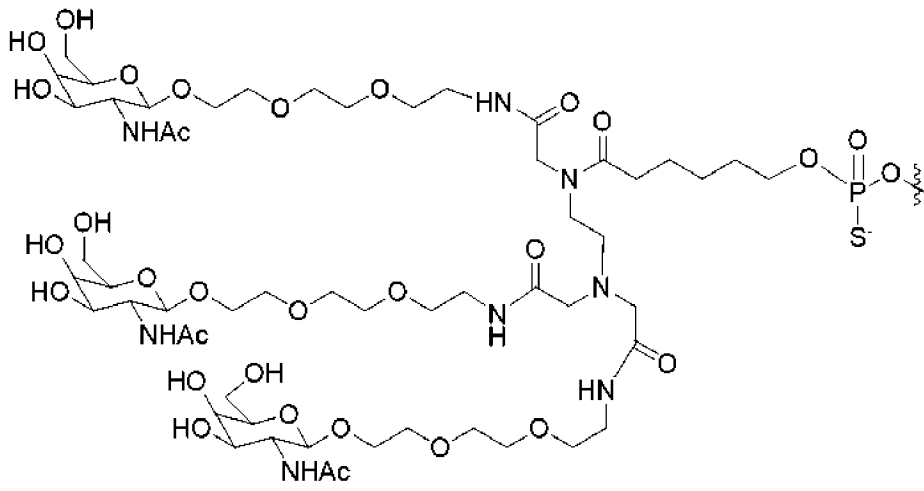
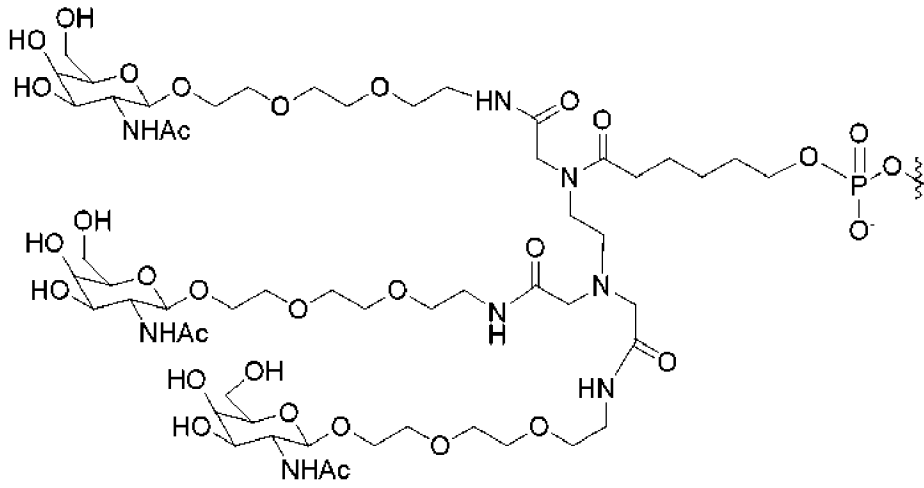
GLS-9,

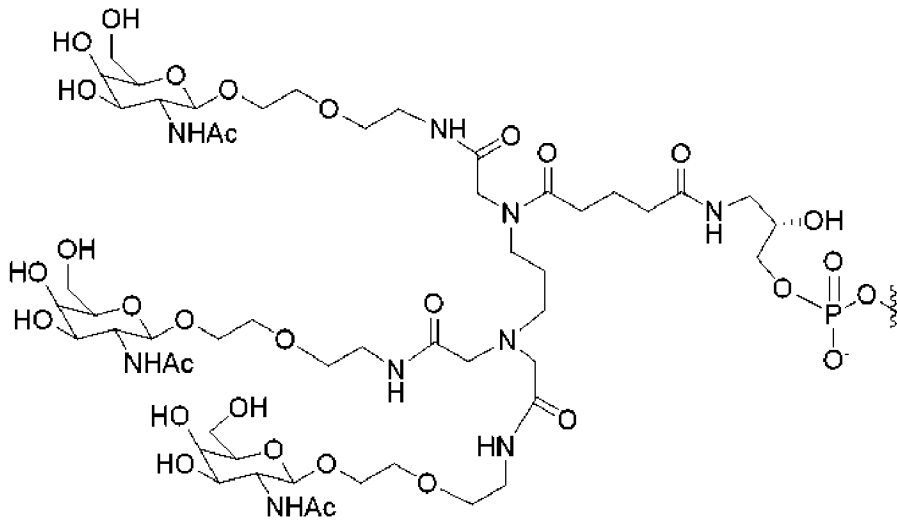


GLO-10,

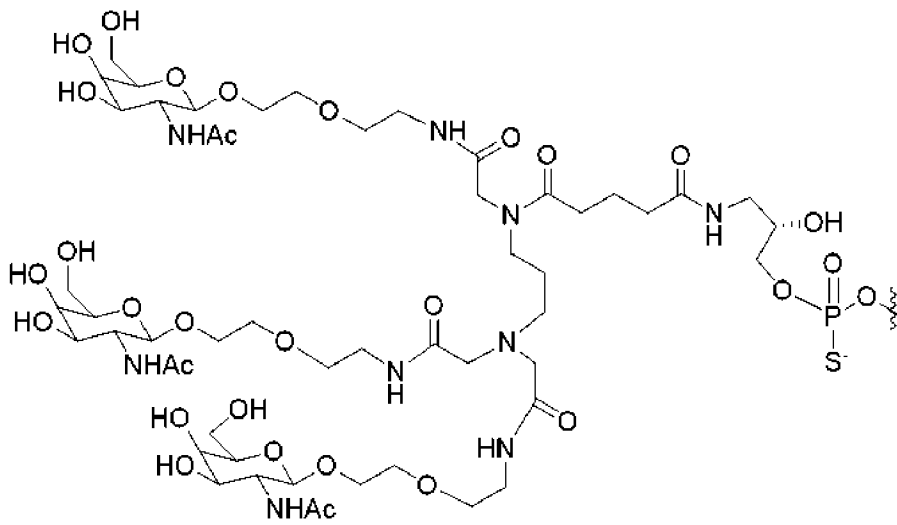


GLS-10,

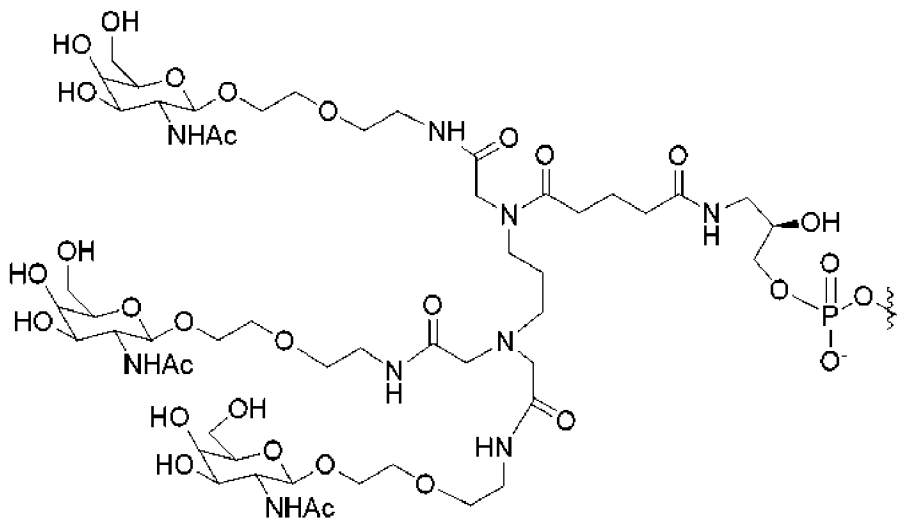




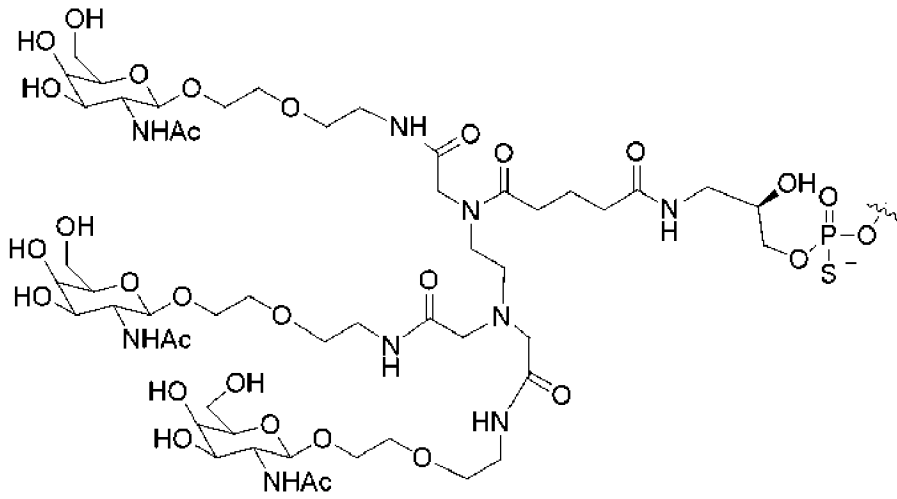
GLO-13,



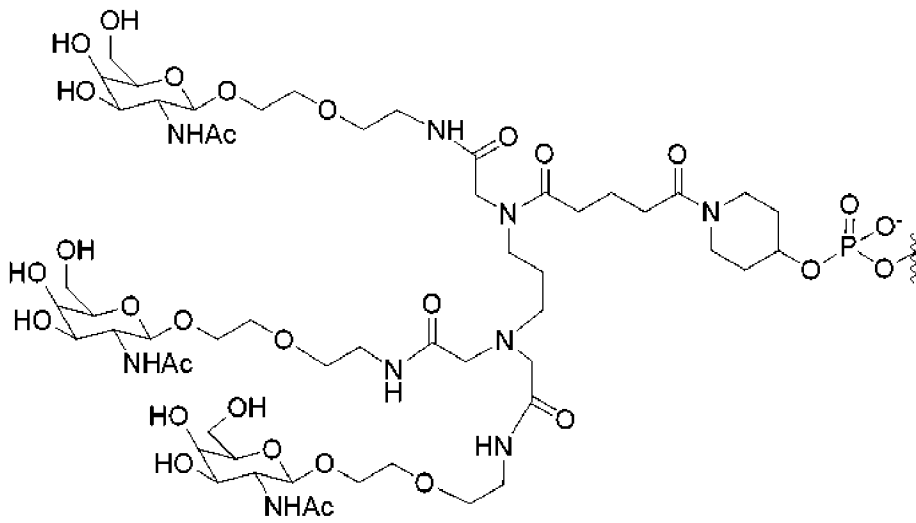
GLS-13,



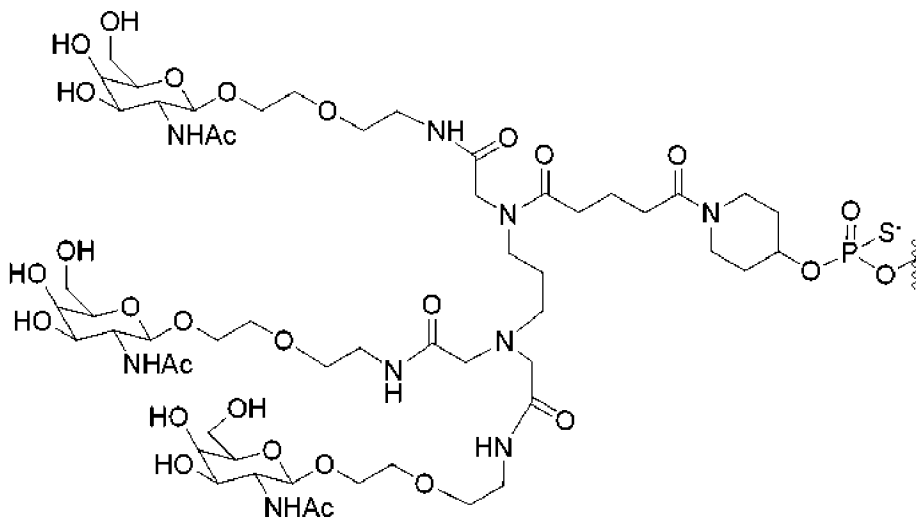
GLO-14,



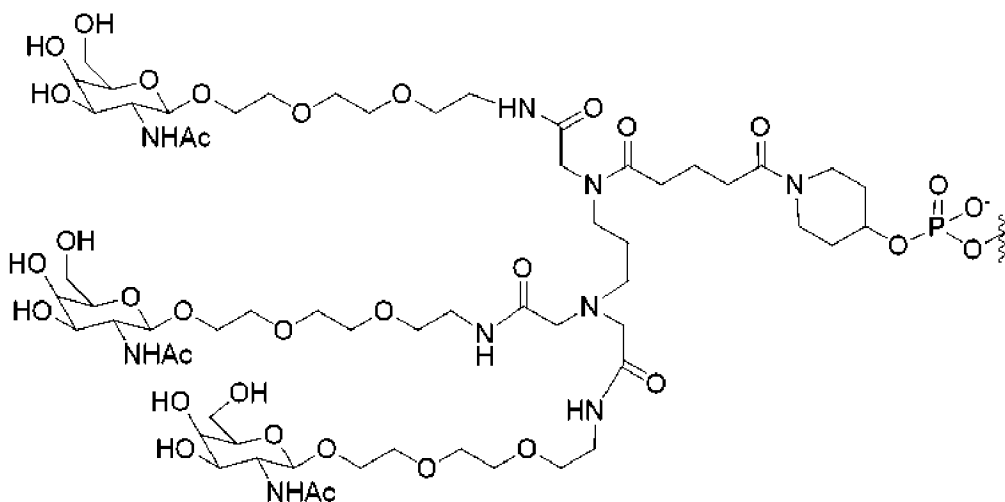
GLS-14,



GLO-15,

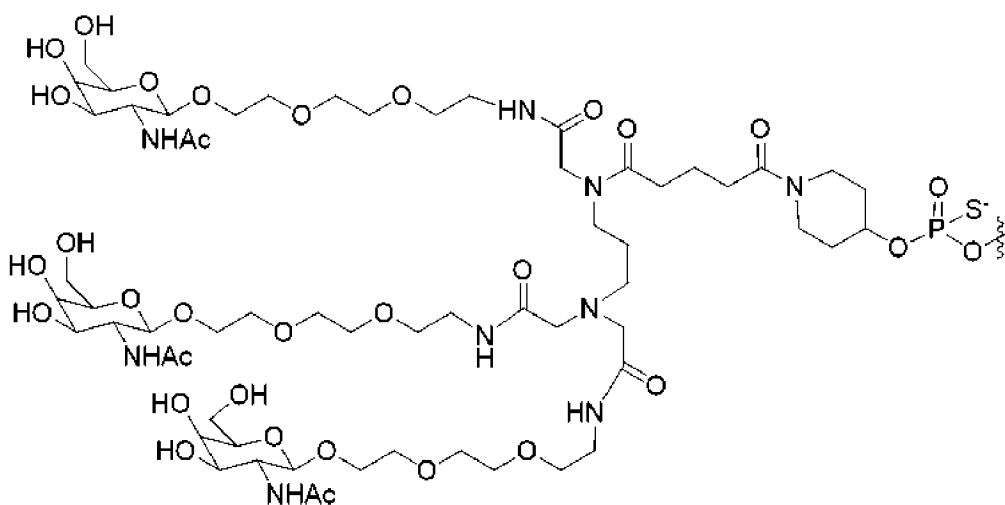


GLS-15,



GLO-16

или



GLS-16.

В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит нацеливающую группу, конъюгированную с 5'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит нацеливающую группу, конъюгированную с 3'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит инвертированный остаток с удаленным азотистым основанием на 3'-конце. В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит один или два инвертированных остатка с удаленными азотистыми основаниями на 3'- и/или 5'-концах. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA имеет два тупых конца. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-липкий конец длиной по меньшей мере в 1 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-липкий конец длиной по меньшей мере 2 нуклеотида.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к олигомерам типа "открытой нуклеиновой кислоты" (UNA) для применения в терапии. Незамкнутая нуклеиновая кислота (UNA) представляет собой ациклический аналог РНК, в котором связь между атомами С2' и С3' рибозного кольца разорвана. Было показано, что включение UNA хорошо переносится и в некоторых случаях даже усиливает активность

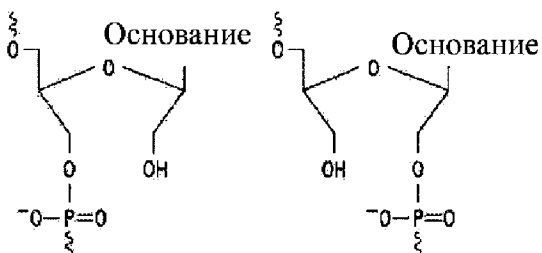
сайленсинга генов посредством siRNA (Meghan A. et al. “Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals”. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5680-5689).

UNA представляет собой термолabileную модификацию, и замена рибонуклеотидов на UNA приведет к снижению прочности спаривания оснований и стабильности дуплекса. Стратегическое размещение UNA в области затравки антисмысловой нити siRNA может обеспечивать снижение нецелевой активности в механизмах сайленсинга генов, опосредованных микроРНК (miRNA). miRNA в основном распознает гены-мишени посредством спаривания оснований между областью затравки антисмысловой нити (положения 2-8 с 5'-конца) и мРНК-мишени для супрессии генов. Каждая miRNA способна регулировать большое количество генов. Антисмысловая нить siRNA, загруженная РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC), также может потенциально регулировать большое количество непредусмотренных генов посредством механизмов, опосредованных miRNA. Поэтому добавление термолabileных нуклеотидов, таких как UNA, в область затравки siRNA может обеспечивать снижение нецелевой активности (Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 15 сентября 2015 г.;4(9):e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23. PMID: 26372022; PMCID: PMC4877448.). В частности, такие РНК-олигонуклеотиды или комплексы РНК-олигонуклеотидов содержат по меньшей мере один мономер нуклеотида типа UNA в области затравки (Narendra Vaish et al. “Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analog”. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 5 1823-1832).

Потенциальные преимущества включения UNA в РНК-олигонуклеотиды или комплексы РНК-олигонуклеотидов в соответствии с настоящим техническим решением включают без ограничения следующее.

1. Снижение нецелевой активности. Добавление UNA в область затравки siRNA будет обеспечивать снижение прочности спаривания оснований в области затравки, тем самым снижая потенциальную нецелевую активность, вызванную механизмом микро-РНК.
2. Хорошая переносимость UNA с точки зрения активности siRNA. В некоторых случаях UNA может привести к повышению активности.

Иллюстративные мономеры UNA, которые можно применять в данном техническом решении, включают без ограничения



В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA представляет собой модифицированный дуплекс, выбранный из любого из дуплексов AD00158-19-2,

AD00158-19-1, AD00158-3, AD00158-1, AD00158-2, AD00158, AD00159, AD00159-1, AD00159-2, AD00159-19-1, AD00159-19-2, AD00163, AD00163-1, AD00163-2, AD00163-19-1, AD00163-19-2, AD00163-3, AD00300-1, AD00300-19-1 и AD00300-19-2 в таблицах 2-4.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA представляет собой модифицированный дуплекс, выбранный из любого из дуплексов AV01227, AV01228, AV01229, AV01230, AV01231, AV01232, AV01233, AV01234, AV01235, AV01236, AV01237, AV01238, AV01239, AV01240, AV01241, AV01242, AV01243, AV01244, AV01245, AV01246, AV01247, AV01248, AV01249, AV01250, AV01251, AV01252, AV01253, AV01254, AV01255, AV01256 и AV01257 в таблицах 2-4.

Согласно одному из аспектов изобретения представлена композиция, предусматривающая любой вариант осуществления вышеописанного аспекта настоящего изобретения, представляющего собой средство на основе dsRNA. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит одно или несколько дополнительных терапевтических средств. В определенных вариантах осуществления композиция упакована в наборы, контейнеры, пакеты, дозаторы, предварительно заполненные шприцы или флаконы. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для подкожного или внутривенного (IV) введения.

Согласно другому аспекту изобретения представлена клетка, предусматривающая любой вариант осуществления вышеописанного аспекта настоящего изобретения, представляющего собой средство на основе dsRNA. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку человека.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения представлен способ подавления экспрессии гена AGT в клетке, при этом способ включает (i) получение клетки, содержащей эффективное количество любого варианта осуществления вышеупомянутого средства на основе dsRNA или вышеупомянутой композиции по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает (ii) поддержание полученных клеток в течение времени, достаточного для разрушения мРНК-транскрипта гена AGT, с обеспечением таким образом подавления экспрессии гена AGT в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетки находятся в организме человека, и средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно. В некоторых вариантах осуществления клетки находятся в организме субъекта, и средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV введения. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает оценку подавления гена AGT после введения субъекту средства на основе dsRNA, где средства такой оценки включают: (i) определение у субъекта одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT; и (ii) сравнение определенной физиологической характеристики с физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, на исходном уровне до лечения и/или контрольной физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, где в результате сравнения определяют наличие или

отсутствие подавления экспрессии гена AGT у субъекта. В некоторых вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является уровень AGT в крови. В некоторых вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является артериальное давление, которое включает систолическое артериальное давление (SBP), диастолическое артериальное давление (DBP) и среднее артериальное давление (MAPR). Снижение уровня AGT в крови и/или артериального давления указывает на снижение экспрессии гена AGT у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения представлен способ подавления экспрессии гена AGT у субъекта, который включает введение субъекту эффективного количества варианта осуществления вышеуказанного аспекта, представляющего собой средство на основе dsRNA, или одного из вариантов осуществления вышеуказанной композиции. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV введения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает оценку подавления гена AGT после введения средства на основе dsRNA, где средства оценки включают: (i) определение у субъекта одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT; (ii) сравнение определенной физиологической характеристики с физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, на исходном уровне до лечения и/или контрольной физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, где в результате сравнения определяют наличие или отсутствие подавления экспрессии гена AGT у субъекта. В некоторых вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является уровень AGT в крови; в некоторых вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является артериальное давление, которое включает систолическое артериальное давление (SBP), диастолическое артериальное давление (DBP) и среднее артериальное давление (MAPR). Снижение уровней AGT в крови и/или артериального давления указывает на снижение экспрессии гена AGT у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения представлен способ лечения заболевания или состояния, ассоциированных с белком AGT, который включает введение субъекту эффективного количества любого варианта осуществления вышеуказанного аспекта, представляющего собой средство на основе dsRNA по настоящему изобретению, или вышеуказанной композиции по настоящему изобретению для обеспечения подавления экспрессии гена AGT. В определенных вариантах осуществления связанное с AGT нарушение выбрано из следующего: гипертензия, высокое артериальное давление, пограничная гипертензия, первичная гипертензия, вторичная гипертензия, изолированная систолическая или диастолическая гипертензия, гипертензия беременных, диабетическая гипертензия, резистентная гипертензия, рефрактерная гипертензия, пароксизмальная гипертензия, реноваскулярная гипертензия, гипертензия Голдблатта, внутриглазная гипертензия, глаукома, легочная гипертензия, портальная гипертензия, системная венозная

гипертензия, систолическая гипертензия, нестабильная гипертензия, гипертоническая болезнь сердца, гипертоническая нефропатия, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатия, диабетическая нефропатическая дегенерация, диабетическая ретинопатия, хроническая сердечная недостаточность, кардиомиопатия, диабетическая кардиомиопатия, гломерулосклероз, аортальный стеноз, аневризма аорты, фиброз желудочков, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, стенокардия, инсульт, заболевание почек, почечная недостаточность, системный склероз, внутриутробная задержка развития (IUGR) и задержка развития плода. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение дополнительной схемы лечения субъекту. В некоторых вариантах осуществления дополнительная схема лечения включает лечение заболевания или состояния, ассоциированных AGT. В определенных вариантах осуществления дополнительная схема лечения предусматривает: введение субъекту одного или нескольких AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению; введение субъекту терапевтического средства, отличного от AGT-специфической dsRNA, и обеспечение изменения образа жизни субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство, отличное от AGT-специфической dsRNA, представляет собой одно из следующего: дополнительные терапевтические средства, такие как диуретики, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ACE), антагонисты рецепторов ангиотензина II, бета-блокаторы, вазодилататоры, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты альдостерона, α 2-агонисты, ингибиторы ренина, α -блокаторы, периферически действующие адренергические средства, селективные частичные агонисты рецептора D1, неселективные альфа-адренергические антагонисты, синтетические стероидные антиминералокортикоиды или комбинации любых из вышеперечисленных средств, а также терапевтические средства от гипертензии в виде фармацевтических комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV введения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение эффективности введенного субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA). В некоторых вариантах осуществления средства для определения эффективности лечения субъекта включают: (i) определение у субъекта одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT; (ii) анализ корреляции определенных физиологических характеристик с заболеванием или состоянием, ассоциированными с AGT, где в результате сравнения определяют одно или несколько из наличия, отсутствия и уровня эффективности средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), введенного субъекту. В некоторых вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является уровень AGT в крови; в некоторых вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является артериальное давление, которое включает систолическое артериальное давление (SBP), диастолическое артериальное давление (DBP) и среднее артериальное давление (MAPR). Снижение

уровней AGT в крови и/или артериального давления указывает на наличие эффективности средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), введенного субъекту.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения представлен способ снижения уровня белка AGT у субъекта по сравнению с уровнем белка AGT у субъекта на исходном уровне до лечения, включающий введение субъекту эффективного количества любого варианта осуществления вышеуказанного аспекта, представляющего собой средство на основе dsRNA, или любого варианта осуществления вышеуказанной композиции по настоящему изобретению для обеспечения снижения уровня экспрессии гена AGT. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или IV.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения представлен способ изменения физиологической характеристики заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта по сравнению с физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта на исходном уровне до лечения, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества любого варианта осуществления вышеуказанного аспекта, представляющего собой средство на основе dsRNA по настоящему изобретению, или любого варианта осуществления вышеуказанной композиции по настоящему изобретению для обеспечения изменения физиологической характеристики заболевания или состояния, ассоциированных с AGT у субъекта. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или IV. В определенных вариантах осуществления физиологической характеристикой является уровень AGT в крови; в определенных вариантах осуществления определяемой физиологической характеристикой является артериальное давление, которое включает систолическое артериальное давление (SBP), диастолическое артериальное давление (DBP) и среднее артериальное давление (MAPR).

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Дуплексы AD00051 - AD00122-19-2, AD00163-3, AV01227 - AVAV01257 и AV01711 приведены в таблице 1, также показаны последовательности их смысловых нитей.

Дуплексы AD00051 - AD00122-19-2, AD00163-3, AV01227 - AVAV01257 и AV01711 приведены в таблице 1, также показаны последовательности их антисмысловых нитей.

SEQ ID NO: 519 представляет собой мРНК ангиотензиногена (AGT) человека [эталонная последовательность в NCBI: NM_001384479.1]:

GAAGAAGCTGCCGTTGTTCTGGGTA CTACAGCAGAAGGGTATGCGGAAGCGA
GCACCCAGTCTGAGATGGCTCCTGCCGGTGTGAGCCTGAGGGCCACCATCCTCTGC
CTCCTGGCCTGGGCTGGCCTGGCTGCAGGTGACCGGGTGTACATACACCCCTTCCAC
STCGTCATCCACAATGAGAGTACCTGTGAGCAGCTGGCAAAGGCCAATGCCGGGAA
GCCCAAAGACCCACCTTCATACCTGCTCCAATTCAGGCCAAGACATCCCCTGTGGA
TGAAAAGGCCCTACAGGACCAGCTGGTGCTAGTCGCTGCAAACTTGACACCGAAG
ACAAGTTGAGGGCCGCAATGGTCGGGATGCTGGCCAACCTTCTGGGCTTCCGTATAT
ATGGCATGCACAGTGAGCTATGGGGCGTGGTCCATGGGGCCACCGTCCTCTCCCAA

CGGCTGTCTTTGGCACCCCTGGCCTCTCTCTATCTGGGAGCCTTGGACCACACAGCTG
ACAGGCTACAGGCAATCCTGGGTGTTCCCTTGGAAAGGACAAGAAGTGCACCTCCCGG
CTGGATGCGCACAAAGGTCCTGTCTGCCCTGCAGGCTGTACAGGGCCTGCTAGTGGCC
CAGGGCAGGGCTGATAGCCAGGCCAGCTGCTGCTGTCCACGGTGGTGGGCGTGTT
CACAGCCCCAGGCCTGCACCTGAAGCAGCCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCTATAAC
CCCTGTGGTCCTCCCACGCTCTCTGGACTTCACAGAAGTGGATGTTGCTGCTGAGAA
GATTGACAGGTTTCATGCAGGCTGTGACAGGATGGAAGACTGGCTGCTCCCTGATGG
GAGCCAGTGTGGACAGCACCCCTGGCTTTCAACACCTACGTCCACTTCCAAGGGAAG
ATGAAGGGCTTCTCCCTGCTGGCCGAGCCCCAGGAGTTCTGGGTGGACAACAGCAC
CTCAGTGTCTGTTCCCATGCTCTCTGGCATGGGCACCTTCCAGCACTGGAGTGACAT
CCAGGACAAGTTCGCTGACTCAAGTGCCCTTCACTGAGAGCGCCTGCCTGCTGCT
GATCCAGCCTCACTATGCCTCTGACCTGGACAAGGTGGAGGGTCTCACTTTCCAGCA
AACTCCCTCAACTGGATGAAGAACTATCTCCCCGGACCATCCACCTGACCATGCC
CCAAGTGGTGTGCAAGGATCTTATGACCTGCAGGACCTGCTCGCCCAGGCTGAGCT
GCCCCGCAATTCTGCACACCGAGCTGAACCTGCAAAAATTGAGCAATGACCGCATCA
GGGTGGGGGAGGTGCTGAACAGCATTTTTTTTGGAGCTTGAAGCGGATGAGAGAGAG
CCCACAGAGTCTACCCAACAGCTTAACAAGCCTGAGGTCTTGAGGTTGACCCTGAA
CCGCCATTCTGTTTGCTGTGTATGATCAAAGCGCCACTGCCCTGCACTTCTGGGC
CGCGTGGCCAACCCGCTGAGCACAGCATGAGGCCAGGGCCCCAGAACACAGTGCCT
GGCAAGGCCTCTGCCCTGGCCTTTGAGGCAAAGGCCAGCAGCAGATAACAACCCC
GGACAAATCAGCGATGTGTCACCCCCAGTCTCCACCTTTTCTTCTAATGAGTCGAC
TTTGAGCTGGAAAGCAGCCGTTTCTCCTTGGTCTAAGTGTGCTGCATGGAGTGAGCA
GTAGAAGCCTGCAGCGGCACAAATGCACCTCCAGTTTGTGTTTATTTTAGAGA
ATGGGGGTGGGGAGGCAAGAACCAGTGTTTAGCGCGGGACTACTGTTCCAAAAAGA
ATTCCAACCGACCAGCTTGTTTGTGAAACAAAAAAGTGTTCCTTTTCAAGTTGAGA
ACAAAAATTGGGTTTTAAATTAAGTATACATTTTTTGCATTGCCTTCGGTTTGTAT
TTAGTGTCTTGAATGTAAGAACATGACCTCCGTGTAGTGTCTGTAATACCTTAGTTTT
TTCCACAGATGCTTGTGATTTTTGACAACAATACGTGAAAGATGCAAGCACCTGAAT
TTCTGTTTGAATGCGGAACCATAGCTGGTTATTTCTCCCTTGTGTTAGTAATAAACGT
CTTGCCACAATAAGCCTCCAAAAA.

SEQ ID NO: 520 представляет собой мРНК ангиотензиногена (AGT) мыши
[эталонная последовательность в NCBI: NM_007428.4]

ATGACTCCCACGGGGGCAGGCCTGAAGGCCACCATCTTCTGCATCTTGACCT
GGGTCAGCCTGACGGCTGGGGACCGCGTATACATCCACCCCTTCCATCTCCTTTACC
ACAACAAGAGCACCTGCGCCCAGCTGGAGAACCCAGTGTGGAGACACTCCCAGAG
TCAACGTTTCGAGCCTGTGCCATTTCAGGCCAAGACCTCCCCTGTGAATGAGAAGACC
CTGCATGATCAGCTCGTGCTGGCCGCCGAGAAGCTAGAGGATGAGGACCGGAAGCG
GGCTGCCAGGTCGCAATGATCGCCAACTTCGTGGGCTTCCGCATGTACAAGATGCT
GAATGAGGCAGGAAGTGGGGCCAGTGGGGCCATCCTCTCACCACCAGCTCTCTTTG
GCACCCTGGTCTCTTTCTACCTTGGATCCTTAGATCCCACGGCCAGCCAGCTGCAGA

CGCTGCTGGATGTCCCTGTGAAGGAGGGAGACTGCACCTCCCGACTAGATGGACAC
 AAGGTCCTCGCTGCCCTGCGGGCCATTCAGGGCTTGCTGGTCACCCAGGGTGGGAGC
 AGCAGCCAGACACCCCTGCTACAGTCCATTGTGGTGGGGCTCTTCACTGCTCCAGGC
 TTTCGTCTAAAGCACTCATTGTTCAGAGCCTGGCTCTCTTTACCCCTGCCCTCTTCC
 CACGCTCTCTGGATTTATCCACTGACCCAGTTCTTGCCACTGAGAAAATCAACAGGT
 TCATAAAGGCTGTGACAGGGTGGAAAGATGAACTTGCCACTGGAGGGGGTCAGTACA
 GACAGCACCCCTACTTTTCAACACCTACGTTCACTTCCAAGGAACGATGAGAGGTTTC
 TCTCAGCTGCCTGGAGTCCATGAATTCTGGGTGGACAACAGCATCTCGGTGTCTGTG
 CCCATGATCTCCGGCACTGGCAACTTCCAGCACTGGAGTGACACCCAGAACAACCTTC
 TCCGTGACGTGCGTGCCCCTAGGTGAGAGAGCCACCCTGCTGCTCATCCAGCCCCAC
 TGCACCTCAGATCTCGACAGGGTGGAGGCCCTCATCTTCCGGAACGACCTCCTGACT
 TGGATAGAGAACCCGCCTCCTCGGGCCATCCGCCTGACTCTGCCCCAGCTGGAAATC
 CGAGGATCCTACAATCTGCAGGACCTGCTGGCTGAGGACAAGCTGCCACCCCTTTTG
 GGTGCGGAGGCAAATCTGAACAACATTGGTGACACCAACCCCCGAGTGGGAGAGGT
 TCTCAATAGCATCCTCCTCGAACTCAAAGCAGGAGAGGAGGAACAGCCGACCACGT
 CTGTCCAGCAGCCTGGCTCACCGGAGGCACTGGATGTGACCCTGAGCAGCCCCTTCC
 TGTTCCGCATCTACGAGCAGGACTCAGGCACGCTGCACTTTCTGGGCAGAGTGAATA
 ACCCCCAGAGTGTGGTGTGA

SEQ ID NO: 521 представляет собой мРНК ангиотензиногена (AGT) яванского макака [эталонная последовательность в NCBI: NM_001283634.1]

ATGCAGAAGCGAGCACCCAGTCCGAGATGGCTCCTGCCAGCGTGAGCCTGA
 GGGCCACCATCCTCTGCCTCCTGGCCTGGGCTGGCCTGGCCACAGGTGACCGGGTGT
 ACATACACCCCTTCCACCTCGTCATCCACAATGAGAGTACCTGTGAGCAGCTGGCAA
 AGGCCGATGCTGGGAAGCCAAAGATCCACCTTACACCTGTTCCGATACAGGCC
 AAGACGTCTCCTGTGGATGAAAAGGCCCTGCAGGACCAGCTAGTGCTGGTTGCCGC
 AAAACTCGACACCGAGGACAAGTTGAGAGCCGCGATGGTCGGGATGCTGGCCAACT
 TCTTGGGCTTCCGTATATATGGCATGCACAGTGAGCTATGGGGCGTGGTCCATGGGG
 CCACCATCCTCTCCCAACGGCTGTCTTTGGCACCCCTGGCCTCTCTTACCTGGGAGC
 GTTGGACCACACAGCCGACAGGCTACAGGCAATCCTGGGCGTCCCTTGGAAAGGACA
 AGAACTGCACCTCCCGGCTGGATGCGCACAAGGTCCTCTCTGCCCTGCAGGCTGTAC
 AGGGCCTGCTGGTGGCCCAGGGCAGGGCTGACGGCCAGTCCCAGCTGCTGTTGTCC
 ACAGTGGTGGGTCTCTTACAGCCCCAGATCTGCACCTGAAGCAGCCGTTTGTGCAG
 GGCTGGCTCTCTATGCCCTGTGGTCTCCTCCACGCTCTCTGGACTTACAGACCTGG
 AAGTCGCTGCTGAGAAGATTGACAGGTTTCATGCAGGCTGTGACAGGATGGAAGATT
 AGCAGCCCCCTGACGGGAGCCAGTGCGGACAGCACCCCTGGTTTTCAACACCTACGT
 CCATTTCCAAGGGAAGATGAGGGACTTCTTCCCTGCTGGCTGAGCCCCAGGAGTTCTG
 GGTGGACAACAGCACCTCAGTGTCTGTCCCATGCTGTCTGGCGTGGGCACCTTCCA
 GCACTGGAGCGACGCCAGGACAACCTTCTCAGTGAAGTGCCTTTACTGAGA
 GCGCCTGCTTGTGCTGATTACGCCTCACTACGCCTCTGACCTGGACAAGGTGGAGG
 GTCTCACTTTCCAGCAAACTCCCTCAACTGGATGAAGAACTGTCTCCCCGGGCCA

TCCACCTGACCATGCCCGACTGGTGCTGCGAGGATCTTATGACCTGCAGGACCTGC
 TTGCCCAGGCTGAGCTGCCCGCCATTCTGGGCACCGAGCTGAACCTGCAAAAATTGA
 GCAATGACAACCTCAGGGTGGGGAAGGTGCTGAACAGCATTTCTTTTTGAACTCGAA
 GCGGATGAGAGAGAGCCCACAGAGTCTACCCGACAGCTGAACAGGCCTGAGTTCTT
 GGAGGTGACCCTGGACCGCCCATTCCTGTTTGCTGTGTATGATCAAAGTGCCACTGC
 CCTGCACTTCCTGGGCCGTGTGGCCAACCCGCTGAGCCCAGCATGA

В последовательностях, представленных в таблице 2, химические модификации обозначены следующим образом: верхний регистр - 2'-фтор; нижний регистр - 2'-ОМе; тиофосфат - *.

В последовательностях, приведенных в таблице 3, молекулы доставки, используемые в исследованиях *in vivo*, обозначены “GLO-0” на 3'-конце каждой смысловой нити. Химические модификации представлены следующим образом: верхний регистр - 2'-фтор; нижний регистр - 2'-ОМе; тиофосфат - *; незамкнутая нуклеиновая кислота - UNA (примечание: AD00052, AD00113-AD00260: без UNA; AD00282-AD00301: версия с UNA).

В последовательностях, представленных в таблице 4, химические модификации обозначены следующим образом: верхний регистр - 2'-фтор; нижний регистр - 2'-ОМе; тиофосфат - *; Invab=инвертированный остаток с удаленным азотистым основанием.

Описание графических материалов На фигуре 1 представлен график, демонстрирующий уровни белка AGT в сыворотке крови яванских макак после введения 2 мг/кг AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1 и AD00300-1 соответственно.

На фигуре 2 представлен график, демонстрирующий уровни белка AGT в сыворотке крови яванских макак после введения 10 мг/кг AD00163-3.

На фигуре 3 представлен график, демонстрирующий изменения SBP в сыворотке крови яванских макак после введения 10 мг/кг AD00163-3.

На фигуре 4 представлен график, демонстрирующий среднее артериальное давление (MBP) у яванских макак после введения 10 мг/кг AD00163-3.

На фигуре 5 представлен график, демонстрирующий диастолическое артериальное давление (DBP) у яванских макак после введения 10 мг/кг AD00163-3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают средства для RNAi, способные подавлять экспрессию гена ангиотензиногена (AGT), например без ограничения двухнитевые (ds) средства для RNAi. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения также включают композиции, содержащие средства для AGT-специфической RNAi, и способы применения таких композиций. Средства для AGT-специфической RNAi, раскрытые в данном документе, могут быть присоединены к соединениям для доставки для обеспечения доставки в клетки, в том числе доставки в гепатоциты. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере одно средство на основе dsAGT и соединение для доставки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение для доставки

представляет собой GalNAc-содержащее соединение для доставки. Средства для AGT-специфической RNAi, доставляемые в клетки, способны подавлять экспрессию гена AGT с обеспечением таким образом снижения активности белкового продукта гена AGT в клетке. dsRNAi-средства по настоящему изобретению можно применять для лечения заболеваний и состояний, ассоциированных с AGT. Такие dsRNAi-средства включают, например, дуплексы AD00051 - AD00122-19-2, представленные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные dsRNAi-средства включают, например, дуплексы AD00158, AD00163, AD00159, AD00290, AD00300 или AD00122. В других вариантах осуществления предпочтительные dsRNAi-средства включают, например, AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00163-3, AD00159-1 или AD00300-1. В некоторых других вариантах осуществления такие dsRNAi-средства включают варианты дуплексов, такие как варианты дуплексов AD00158, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 или AD00122.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения снижение экспрессии AGT в клетке или организме субъекта обеспечивает лечение заболевания или состояния, ассоциированного с экспрессией AGT в клетке или организме субъекта соответственно. Неограничивающими примерами заболеваний и состояний, которые можно лечить путем снижения активности AGT, являются: гипертензия, высокое артериальное давление, пограничная гипертензия, первичная гипертензия, вторичная гипертензия, изолированная систолическая или диастолическая гипертензия, гестационная гипертензия, диабетическая гипертензия, резистентная гипертензия, рефрактерная гипертензия, пароксизмальная гипертензия, реноваскулярная гипертензия, гипертензия Голдблатта, внутриглазная гипертензия, глаукома, легочная гипертензия, портальная гипертензия, системная венозная гипертензия, систолическая гипертензия, нестабильная гипертензия, гипертоническая болезнь сердца, гипертоническая нефропатия, атеросклероз, артериосклероз, заболевание сосудов, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, хроническая сердечная недостаточность, кардиомиопатия, диабетическая кардиомиопатия, гломерулосклероз, аортальный стеноз, аневризма аорты, фиброз желудочков, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, стенокардия напряжения, инсульт, заболевание почек, почечная недостаточность, системный склероз, внутриутробная задержка развития (IUGR) и задержка развития плода.

Ниже описаны способы получения и применения композиций, содержащих AGT-специфические средства на основе однонитевой (ssRNA) и двухнитевой (dsRNA) рибонуклеиновой кислоты для подавления экспрессии гена AGT, а также композиции и способы для лечения заболеваний и состояний, вызванных или регулируемых экспрессией гена AGT. Термин “RNAi” также известен в данной области техники и может быть указан как “siRNA”.

При использовании в данном документе термин “RNAi” относится к средству, которое содержит РНК и опосредует направленное расщепление РНК-транскрипта посредством РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). Как известно в данной

области техники, область-мишень для RNAi относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы РНК, образующейся в процессе транскрипции генов, включая информационную РНК (мРНК), которая является продуктом процессинга РНК, осуществляемого в отношении первичного продукта транскрипции. Часть последовательности, являющаяся мишенью, будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить субстратом для РНК-направленного расщепления в этой части или рядом с ней. Длина последовательности-мишени может составлять 8-30 нуклеотидов (включительно), 10-30 нуклеотидов (включительно), 12-25 нуклеотидов (включительно), 15-23 нуклеотида (включительно), 16-23 нуклеотида (включительно) или 18-23 нуклеотида (включительно), включая все более короткие длины в пределах каждого указанного диапазона. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения длина последовательности-мишени составляет 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина последовательности-мишени составляет от 9 до 26 нуклеотидов включительно, в том числе все поддиапазоны и целые числа между ними. Например, хотя это и не является ограничивающим фактором, в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения длина последовательности-мишени составляет 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, и она является полностью или по меньшей мере по сути комплементарной по меньшей мере части РНК-транскрипта гена AGT. Некоторые аспекты настоящего изобретения предусматривают фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько средств на основе AGT-специфической dsRNA и фармацевтически приемлемый носитель. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средство для AGT-специфической RNAi, как описано в данном документе, подавляет экспрессию белка AGT.

При использовании в данном документе “средство на основе dsRNA” означает композицию, содержащую РНК- или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотидную молекулу, которая способна разрушать мРНК-транскрипт, являющийся мишенью, или подавлять его трансляцию. Без ограничения конкретной теорией, средства на основе dsRNA по настоящему изобретению могут действовать посредством механизма РНК-интерференции (т. е. индуцировать РНК-интерференцию, взаимодействуя с механизмом пути РНК-интерференции (РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга или RISC) клеток млекопитающих) или действовать посредством любого альтернативного механизма(механизмов) или пути(путей). Способы сайленсинга генов в клетках растений, беспозвоночных и позвоночных хорошо известны в данной области техники (см., например, Sharp et al., *Genes Dev.* 2001, 15:485; Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363; Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309; и Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Средства сайленсинга генов, известные в данной области техники, можно применять в сочетании с изобретением, представленным в данном документе, для обеспечения подавления экспрессии AGT.

Средства на основе dsRNA, раскрытые в данном документе, состоят из смысловой и антисмысловой нитей и включают без ограничения короткие интерферирующие РНК (siRNA), средства для RNAi, микроРНК (miRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA) и субстраты дайсер. Антисмысловая нить описанных в данном документе средств на основе dsRNA по меньшей мере частично комплементарна мРНК, на которую осуществляется нацеливание, и в данной области техники известно, что дуплексные структуры dsRNA различной длины могут использоваться для подавления экспрессии гена-мишени. Например, известно, что dsRNA с дуплексной структурой из 19, 20, 21, 22 и 23 пар оснований эффективно индуцируют РНК-интерференцию (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). В данной области техники известно, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также эффективны для индукции РНК-интерференции. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения АГТ-специфическая dsRNA может содержать по меньшей мере одну нить длиной по меньшей мере 21 нт, или дуплекс может иметь длину, определенную одной из последовательностей, перечисленных в таблицах 1-4, минус 1, 2 или 3 нт, или даже короче. Уменьшение на четыре нуклеотида на одном или обоих концах по сравнению с dsRNA, перечисленными в таблицах 1-4 соответственно, также может быть эффективным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе АГТ-специфической dsRNA могут содержать частичную последовательность, состоящую из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов из одной или нескольких последовательностей из таблиц 1-4, и не отличаться по своей способности подавлять экспрессию гена АГТ на более чем 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% от уровня подавления, обеспечиваемого dsRNA, содержащей всю последовательность (также называемую в данном документе “исходной” последовательностью).

В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают включение однонитевой РНК в композицию и/или введение однонитевой РНК субъекту. Например, антисмысловые нити, перечисленные в любой из таблиц 1-4, можно применять в виде композиции или в составе композиции, которая при введении субъекту обеспечивает снижение активности полипептида АГТ и/или экспрессии гена АГТ у субъекта. В таблицах 1-4 приведены последовательности оснований основной части антисмысловой и смысловой нитей некоторых средств на основе АГТ-специфической dsRNA. Однонитевые антисмысловые молекулы, которые могут быть включены в определенные композиции по настоящему изобретению и/или вводиться в определенных способах по настоящему изобретению, называются в данном документе “однонитевые антисмысловые средства” или “средства на основе антисмыслового полинуклеотида”. Однонитевые смысловые молекулы, которые могут быть включены в определенные композиции и/или вводиться в определенных способах по настоящему изобретению, называются в данном документе “однонитевыми смысловыми средствами” или “средствами на основе смыслового полинуклеотида”. Термин “последовательность оснований”, используемый в данном документе, относится к полинуклеотидной

последовательности без химических модификаций или соединений для доставки. Например, смысловая нить, показанная в таблице 1, соответствует соответствующей последовательности оснований в таблице 3; однако для соответствующих последовательностей в таблице 3 показаны соответствующие химические модификации и соединения для доставки. Последовательностям, раскрытым в данном документе, могут быть присвоены идентификаторы. Например, одонитевая смысловая последовательность может быть обозначен с помощью “SS № смысловой нити”; одонитевая антисмысловая последовательность может быть обозначена с помощью “AS № антисмысловой нити”; и дуплекс, содержащий смысловую и антисмысловую нити, может быть обозначен с помощью “AD № дуплекса”.

В таблице 1 указаны смысловые и антисмысловые нити и приведены идентификационные номера дуплексов, образованных смысловыми и антисмысловыми нитями, находящимися в той же строке таблицы 1. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антисмысловая последовательность содержит нуклеиновое основание *u* или нуклеиновое основание *a* в своем первом положении. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антисмысловая последовательность содержит нуклеиновое основание *u* в своем первом положении. При использовании в данном документе термин “совпадающее положение” в определенном смысле относится к положениям в каждой из нитей, которые “образуют пару” друг с другом, если две нити выступают в качестве дуплекса. Например, в смысловой нити из 21 нуклеинового основания и антисмысловой нити из 21 нуклеинового основания нуклеиновое основание в положении 1 смысловой нити находится в “совпадающем положении” с нуклеиновым основанием в положении 21 антисмысловой нити. В другом неограничивающем примере в смысловой нити из 23 нуклеиновых оснований и антисмысловой нити из 23 нуклеиновых оснований нуклеиновое основание в положении 2 смысловой нити находится в совпадающем положении с положением 22 антисмысловой нити. В другом неограничивающем примере в смысловой нити из 18 нуклеиновых оснований и антисмысловой нити из 18 нуклеиновых оснований нуклеиновое основание в положении 1 смысловой нити находится в совпадающем положении с нуклеиновым основанием в положении 18 антисмысловой нити, и нуклеиновое основание в положении 4 смысловой нити находится в совпадающем положении с нуклеиновым основанием в положении 15 антисмысловой нити. Специалисту в данной области техники будет понятно, как установить совпадающие положения между смысловой и антисмысловой нитями дуплексов и спаренных нитей.

В последнем столбце таблицы 1 показан AD №/AV № дуплекса для дуплекса, который содержит смысловую и антисмысловую последовательности, находящиеся в той же строке таблицы. Например, в таблице 1 раскрыт дуплекс, обозначенный с помощью “AD № дуплекса AD00051”, который содержит соответствующие последовательности смысловой и антисмысловой нитей. Таким образом, в каждой строке в таблице 1 указан дуплекс по настоящему изобретению, каждый из которых содержит смысловую и

антисмысловую последовательности, показанные в той же строке, и идентификатор, присвоенный каждому дуплексу, указан в конце строки в столбце.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению субъекту вводят средство для RNAi, содержащее полинуклеотидную последовательность, представленную в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения введенное субъекту средство для RNAi содержит дуплекс, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей оснований, перечисленных в таблице 1, и содержащий 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 модификации последовательности. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению дополнительно предусмотрено присоединение средства для RNAi, содержащего полинуклеотидную последовательность, показанную в таблице 1, к молекуле доставки, неограничивающим примером которой является соединение для доставки, содержащее GalNAc.

Таблица 1. Последовательности антисмысловой и смысловой нитей немодифицированных средств для AGT-специфической RNAi. Все последовательности показаны в направлении от 5'- к 3'-концу. AD №/AV № дуплекса представляет собой номер, присвоенный дуплексу, обе нити которого приведены в одной и той же строке таблицы.

Последовательность оснований смысловой нити 5'→ 3'	SEQ ID NO	Последовательность оснований антисмысловой нити 5'→ 3'	SEQ ID NO	AD №/AV № дуплекса
GCGUCAUCCACAAUGAGAGU A	1	UACUCUCAUUGUGGAUGACG C	98	AD00051
GUCAUCCACAAUGAGAGUAC A	2	UGUACUCUCAUUGUGGAUG AC	99	AD00052
GAUCCACAAUGAGAGUACCU A	3	UAGGUACUCUCAUUGUGGA UC	100	AD00053
GUCCACAAUGAGAGUACCU A	4	UCAGGUACUCUCAUUGUGGA C	101	AD00054
GUUCUUGGGCUUCCGUAUAU A	5	UAUAUACGGAAGCCCAAGAA C	102	AD00055
GUUGGGCUUCCGUAUAUAU GA	6	UCAUAUAUACGGAAGCCCAA C	103	AD00056
GUGGGCUUCCGUAUAUAUG GA	7	UCCAUAUAUACGGAAGCCCA C	104	AD00057
GGCUUCCGUAUAUAUGGCAU	8	UAUGCCAUAUAUACGGAAGC	105	AD00058

A		C		
GCUUCCGUUAUAUAUGGCAUG A	9	UCAUGCCAUAUAUACGGAAG C	106	AD00059
GCGUAUAUAUGGCAUGCACA A	10	UUGUGCAUGCCAUAUAUACG C	107	AD00060
GGUUCCUUGGAAGGACAAG AA	11	UUCUUGUCCUCCAAGGAAC C	108	AD00061
GAGAAGAUUGACAGGUUCA UA	12	UAUGAACCUGUCAAUUCUUCU C	109	AD00062
GAUGCAGGCUGUGACAGGA UA	13	UAUCCUGUCACAGCCUGCAU C	110	AD00063
GGAGUUCUGGGUGGACAAC AA	14	UUGUUGUCCACCCAGAACUC C	111	AD00064
GCAACAGCACCUCAGUGUCU A	15	UAGACACUGAGGUGCUGUU GC	112	AD00065
GGGGUCUCACUUCCAGCAA A	16	UUUGCUGGAAAGUGAGACCC C	113	AD00066
GUCACUUUCCAGCAAAACUC A	17	UGAGUUUUGCUGGAAAGUG AC	114	AD00067
GCCAGCAAAACUCCUCAAC A	18	UGUUGAGGGAGUUUUGCUG GC	115	AD00068
GAGCAAAACUCCUCAACUG A	19	UCAGUUGAGGGAGUUUUGC UC	116	AD00069
GGAGCUGAACCUGCAAAAAU A	20	UAUUUUUGCAGGUUCAGCUC C	117	AD00070
GCUGAACCUGCAAAAAUUGA A	21	UUCAAUUUUUGCAGGUUCA GC	118	AD00071
GGAACCGCCCAUUCCUGUUU A	22	UAAACAGGAAUGGGCGGUU CC	119	AD00072
GAACCGCCCAUUCCUGUUUG A	23	UCAAACAGGAAUGGGCGGU UC	120	AD00073
GUUCCUGUUUGCUGUGUAU	24	UCAUACACAGCAAACAGGAA	121	AD00074

GA		C		
GCUGUUUGCUGUGUAUGAU CA	25	UGAUCAUACACAGCAAACAG C	122	AD00075
GUGUUUGCUGUGUAUGAUC AA	26	UUGAUCAUACACAGCAAACA C	123	AD00076
GUUGCUGUGUAUGAUCAAA GA	27	UCUUUGAUCAUACACAGCAA C	124	AD00077
GUCCCACCUUUUCUUCUAAU A	28	UAUUAGAAGAAAAGGUGGG AC	125	AD00078
GACCUUUUCUUCUAAUGAGU A	29	UACUCAUUAGAAGAAAAGG UC	126	AD00079
GCCUUUUCUUCUAAUGAGUC A	30	UGACUCAUUAGAAGAAAAG GC	127	AD00080
GCGUUUCUCCUUGGUCUAAG A	31	UCUUAGACCAAGGAGAAACG C	128	AD00081
GUUUCUCCUUGGUCUAAGUG A	32	UCACUUAGACCAAGGAGAAA C	129	AD00082
GGUUUGCUGGGUUUAUUUU AA	33	UUAAAUAACCCAGCAAAC C	130	AD00083
GUUUGCUGGGUUUAUUUUUA GA	34	UCUAAAUAACCCAGCAAAA C	131	AD00084
GUUGCUGGGUUUAUUUUAG AA	35	UUCUAAAUAACCCAGCAA C	132	AD00085
GGGGUUUAUUUUAGAGAAU GA	36	UCAUUCUCUAAAUAACCC C	133	AD00086
GGGUUUUAUUUUAGAGAAUG GA	37	UCCAUUCUCUAAAUAACCC C	134	AD00087
GGGCAAGAACCAGUGUUUA GA	38	UCUAAACACUGGUUCUUGCC C	135	AD00088
GGCAAGAACCAGUGUUUAGC A	39	UGC UAAACACUGGUUCUUGC C	136	AD00089
GCAAGAACCAGUGUUUAGCG	40	UCGCUAAACACUGGUUCUUG	137	AD00090

A		C		
GCUGUCCAAAAAGAAUUCC A	41	UGGAAUUCUUUUUGGAACA GC	138	AD00091
GGUCCAAAAAGAAUCCAA A	42	UUUGGAAUUCUUUUUGGAA CC	139	AD00092
GUCCAAAAAGAAUCCAAC A	43	UGUUGGAAUUCUUUUUGGA AC	140	AD00093
GCAAAAAGAAUCCAACCGA A	44	UUCGGUUGGAAUUCUUUUU GC	141	AD00094
GAAAAAGAAUCCAACCGAC A	45	UGUCGGUUGGAAUUCUUUU UC	142	AD00095
GCAACCGACCAGCUUGUUUG A	46	UCAACAAGCUGGUCGGUUG C	143	AD00096
GAACCGACCAGCUUGUUUGU A	47	UACAAACAAGCUGGUCGGUU C	144	AD00097
GGACCAGCUUGUUUGUGAA AA	48	UUUUCACAAACAAGCUGGUC C	145	AD00098
GACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	49	UGUUUCACAAACAAGCUGGU C	146	AD00099
GCCAGCUUGUUUGUGAAACA A	50	UUGUUUCACAAACAAGCUGG C	147	AD00100
GUCAUCCACAAUGAGAGUAC A	51	UGUACUCUCAUUGUGGAUG AC	148	AD00101
GUGGGCUUCCGUAUAUAUG GA	52	UCCAUAUAUACGGAAGCCCA C	149	AD00113
GCUGUUUGCUGUGUAUGAU CA	53	UGAUCAUACACAGCAAACAG C	150	AD00114
GGUUUGCUGGGUUUAUUUU AA	54	UUAAAUAACCCAGCAAAC C	151	AD00115
GCCAGCUUGUUUGUGAAACA A	55	UUGUUUCACAAACAAGCUGG C	152	AD00116
GUCCACCUUUUCUUCUAAU A	56	UAUUAGAAGAAAAGGUGGG C	153	AD00122

A		AC		
GCCUUUUCUUCUAAUGAGUC A	57	UGACUCAUUAGAAGAAAAG GC	154	AD00123
GGGGUUUAUUUUAGAGAAU GA	58	UCAUUCUCUAAAAUAAACCC C	155	AD00124
GGUUCCAAAAAGAAUUCCAA A	59	UUUGGAAUUCUUUUUGGAA CC	156	AD00125
GUUCCAAAAAGAAUUCCAAC A	60	UGUUGGAAUUCUUUUUGGA AC	157	AD00126
CAUCCACAAUGAGAGUACCU A	61	UAGGUACUCUCAUUGUGGA UG	158	AD00154
CUUCUUGGGCUUCCGUUAU A	62	UAUAUACGGAAGCCCAAGAA G	159	AD00155
CAUGCAGGCUGUGACAGGAU A	63	UAUCCUGUCACAGCCUGCAU G	160	AD00156
GCUGAACCUUGCAAAAAUUGA A	64	UUCAUUUUUGCAGGUUCA GC	161	AD00157
CACCUUUUCUUCUAAUGAGU A	65	UACUCAUUAGAAGAAAAGG UG	162	AD00158
CCGUUUCUCCUUGGUCUAAG A	66	UCUUAGACCAAGGAGAAACG G	163	AD00159
ACUGUUCCAAAAAGAAUUCC A	67	UGGAAUUCUUUUUGGAACA GU	164	AD00160
CAAAAAGAAUCCAACCGAC A	68	UGUCGGUUGGAAUUCUUUU UG	165	AD00161
CGACCAGCUUGUUUGUGAAA A	69	UUUUCACAAACAAGCUGGUC G	166	AD00162
GACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	70	UGUUUCACAAACAAGCUGGU C	167	AD00163
UCGUCAUCCACAAUGAGAGU A	71	UACUCUCAUUGUGGAUGACG A	168	AD00252
GUCCACAAUGAGAGUACCU G	72	UCAGGUACUCUCAUUGUGGA A	169	AD00253

A		C		
AGGGUCUCACUUUCCAGCAA A	73	UUUGCUGGAAAGUGAGACCC U	170	AD00254
CUGUUUGCUGUGUAUGAUC AA	74	UUGAUCAUACACAGCAAACA G	171	AD00255
UUUGCUGUGUAUGAUCAAA GA	75	UCUUUGAUCAUACACAGCAA A	172	AD00256
GUUUCUCCUUGGUCUAAGUG A	76	UCACUUAGACCAAGGAGAAA C	173	AD00257
GCAAGAACCAGUGUUUAGCG A	77	UCGCUAAACACUGGUUCUUG C	174	AD00258
CCAAAAGAAUCCAACCGA A	78	UUCGGUUGGAAUUCUUUUU GG	175	AD00259
CAACCGACCAGCUUGUUUGU A	79	UACAAACAAGCUGGUCGGUU G	176	AD00260
GACCUUUUCUUCUAAUGAGU A	80	UACUCAUUAGAAGAAAAGG UC	177	AD00158 -1
GACCUUUCUUCUAGCGAGU A	81	UACUCAUUAGAAGAAAAGG UC	178	AD00158 -2
GACCUUUUCUUCUAAUGAGU A	82	UACUCAUUAGAAGAAAAGG UC	179	AD00158 -3
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	83	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	180	AD00163 -1
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	84	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	181	AD00163 -2
GCGUUUCUCCUUGGUCUAAG A	85	UCUUAGACCAAGGAGAAACG C	182	AD00159 -1
GCGUUUCUCCUUGGUCUAAG A	86	UCUUAGACCAAGGAGAAACG C	183	AD00159 -2
GCAAAAAGAAUCCAACCGA A	87	UUCGGUUGGAAUUCUUUUU GC	184	AD00300 -1
CCUUUUCUUCUAAUGAGUA	88	UACUCAUUAGAAGAAAAGG	185	AD00158

				-19-1
CCAGCUUGUUUGUGAAACA	89	UGUUUCACAAACAAGCUGG	186	AD00163 -19-1
GUUUCUCCUUGGUCUAAGA	90	UCUUAGACCAAGGAGAAAC	187	AD00159 -19-1
AAAAAGAAUCCAACCGAA	91	UUCGGUUGGAAUUCUUUUU	188	AD00300 -19-1
CCCACCUUUUCUUCUAAUA	92	UAUUAGAAGAAAAGGUGGG	189	AD00122 -19-1
CCUUUUCUUCUAAUGAGUU	93	AACUCAUUAGAAGAAAAGG	190	AD00158 -19-2
CCAGCUUGUUUGUGAAACU	94	AGUUUCACAAACAAGCUGG	191	AD00163 -19-2
GUUUCUCCUUGGUCUAAGU	95	ACUUAGACCAAGGAGAAAC	192	AD00159 -19-2
AAAAAGAAUCCAACCGAU	96	AUCGGUUGGAAUUCUUUUU	193	AD00300 -19-2
CCCACCUUUUCUUCUAAU	97	AAUUAGAAGAAAAGGUGGG	194	AD00122 -19-2
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	522	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	523	AD00163 -3
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	528	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	559	AV01227
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC U	529	AGUUUCACAAACAAGCUGGU G	560	AV01228
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC C	530	GGUUUCACAAACAAGCUGGU G	561	AV01229
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC G	531	CGUUUCACAAACAAGCUGGU G	562	AV01230
AGCUUGUUUGUGAAACA	532	UGUUUCACAAACAAGCU	563	AV01231
CAGCUUGUUUGUGAAACA	533	UGUUUCACAAACAAGCUG	564	AV01232
ACAGCUUGUUUGUGAAACA	534	UGUUUCACAAACAAGCUGU	565	AV01233

UCAGCUUGUUUGUGAAACA	535	UGUUUCACAAACAAGCUGA	566	AV01234
GCAGCUUGUUUGUGAAACA	536	UGUUUCACAAACAAGCUGC	567	AV01235
CCAGCUUGUUUGUGAAACA	537	UGUUUCACAAACAAGCUGG	568	AV01236
ACCAGCUUGUUUGUGAAACA	538	UGUUUCACAAACAAGCUGGU	569	AV01237
UCCAGCUUGUUUGUGAAACA	539	UGUUUCACAAACAAGCUGGA	570	AV01238
GCCAGCUUGUUUGUGAAACA	540	UGUUUCACAAACAAGCUGGC	571	AV01239
CCCAGCUUGUUUGUGAAACA	541	UGUUUCACAAACAAGCUGGG	572	AV01240
GACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	542	UGUUUCACAAACAAGCUGGU C	573	AV01241
AACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	543	UGUUUCACAAACAAGCUGGU U	574	AV01242
UACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	544	UGUUUCACAAACAAGCUGGU A	575	AV01243
CGACCAGCUUGUUUGUGAAA CA	545	UGUUUCACAAACAAGCUGGU CG	576	AV01244
CCGACCAGCUUGUUUGUGAA ACA	546	UGUUUCACAAACAAGCUGGU CGG	577	AV01245
ACCGACCAGCUUGUUUGUGA AACA	547	UGUUUCACAAACAAGCUGGU CGGU	578	AV01246
AACCGACCAGCUUGUUUGUG AAACA	548	UGUUUCACAAACAAGCUGGU CGGUU	579	AV01247
CAACCGACCAGCUUGUUUGU GAAACA	549	UGUUUCACAAACAAGCUGGU CGGUUG	580	AV01248
GAAUCCAACCGACCAGCUU GUUUGUGAAACA	550	UGUUUCACAAACAAGCUGGU CGGUUGGAAUUC	581	AV01249
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	551	UGUUUCACAAACAAGCUGGU GUU	582	AV01250
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	552	UGUUUCACAAACAAGCUGGU GGA	583	AV01251
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	553	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	584	AV01252
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC	554	UGUUUCACAAACAAGCUGGU	585	AV01253

A		G		
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	555	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	586	AV01254
CACCAGCUUGUUUGUAAAAC A	556	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	587	AV01255
CACCAGCUUGUUUGUGAAAU A	557	UAUUUCACAAACAAGCUGGU G	588	AV01256
CACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	558	UGUUUCACAAACAAGCUGGU G	589	AV01257
CCAGCUUGUUUGUGAAAC	652	GUUUCACAAACAAGCUGG	653	AV01711

В таблице 2 приведены последовательности антисмысловой и смысловой нитей определенных химически модифицированных средств для AGT-специфической RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению в клетку и/или субъекту вводят средство для RNAi, имеющее полинуклеотидную последовательность, представленную в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению субъекту вводят средство для RNAi, имеющее полинуклеотидную последовательность, представленную в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство для RNAi, вводимое субъекту, содержит дуплексы, отмеченные в первом столбце таблицы 2, и содержит модификации последовательностей смысловой и антисмысловой нитей, показанные в третьем и шестом столбцах одной и той же строки таблицы 2 соответственно. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению последовательности, представленные в таблице 2, могут быть соединены с (также упоминается в данном документе как “конъюгированы с”) соединением, способным обеспечивать доставку средства для RNAi к клеткам и/или тканям субъекта. Неограничивающими примерами соединений для доставки, применимых в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, являются GalNAc-содержащие соединения. В таблице 2 в первом столбце представлен AD № или AV № дуплекса для последовательности оснований, соответствующей таблице 1. Для последовательности оснований, обозначенной посредством AD № дуплекса, показаны не только последовательности оснований, содержащиеся в смысловой и антисмысловой нитях, но также показаны химические модификации, приведенные в той же строке таблицы 2. Например, в первой строке таблицы 1 показаны последовательности оснований одонитевых смысловой и антисмысловой последовательностей, которые вместе образуют дуплекс, обозначенный как AD № дуплекса AD00051; при этом AD № дуплекса AD00051, приведенный в таблице 2 как дуплекс, содержит последовательности оснований AD00051-SS и AD00051-AS и содержит химические модификации в смысловой и антисмысловой последовательностях, показанных в третьем и шестом столбцах соответственно. “SS №

смысловой нити” в столбце 2 таблицы 2 представляет собой идентификатор, присвоенный смысловой последовательности (включая модификации), показанной в столбце 3 той же строки. “AS № антисмысловой нити” в пятом столбце таблицы 2 представляет собой идентификатор, присвоенный антисмысловой последовательности (включая модификации), показанной в шестом столбце.

Таблица 2 Представлены последовательности антисмысловой и смысловой нитей химически модифицированных средств для AGT-специфической RNAi. Все последовательности показаны в направлении от 5'- к 3'-концу. Эти последовательности применялись в некоторых исследованиях с испытаниями *in vitro*, описанных в данном документе. Химические модификации представлены следующим образом: верхний регистр - 2'-фтор; нижний регистр - 2'-ОМе; тиофосфат - *

AD № дуплекса	SS № смысловой нити	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	AS № антисмысловой нити	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD00051	AD00051-SS	g*c*gucaucCaCaAugagagu*a	195	AD00051-AS	u*A*cucuCauugUgGaUgac*g*c	245
AD00053	AD00053-SS	g*a*uccacaAuGaGaguaccu*a	196	AD00053-AS	u*A*gguaCucucAuUgUgga*u*c	246
AD00054	AD00054-SS	g*u*ccacaUgAgAguaccug*a	197	AD00054-AS	u*C*agguAcucuCaUuGugg*a*c	247
AD00055	AD00055-SS	g*u*ucuuggGcUuCcguaaua*a	198	AD00055-AS	u*A*uuaCggaaGcCcAaga*a*c	248
AD00056	AD00056-SS	g*u*ugggcuUcCgUauauaug*a	199	AD00056-AS	u*C*auauAuacgGaAgCcca*a*c	249
AD00057	AD00057-SS	g*u*gggcuUcCgUauauaug*a	200	AD00057-AS	u*C*cauaUauacGgAaGccc*a*c	250
AD00058	AD00058-SS	g*g*cuuccgUaUaUauggcau*a	201	AD00058-AS	u*A*ugccAuauaUaCgGaag*c*c	251
AD00059	AD00059-SS	g*c*uuccguAuAuAuggcaug*a	202	AD00059-AS	u*C*augcCauauAuAcGgaa*g*c	252
AD00060	AD00060-SS	g*c*guauauAuGgCaugcaca*a	203	AD00060-AS	u*U*gugcAugccAuAuAuac*g*c	253
AD00061	AD00061-SS	g*g*uuccuuGgAaGgacaaga*a	204	AD00061-AS	u*U*cuugUccuuCcAaGgaa*c*c	254
AD00062	AD00062-SS	g*a*gaagauUgAcAgguucau*a	205	AD00062-AS	u*A*ugaaCcuguCaAuCuuc*u*c	255
AD00063	AD00063-SS	g*a*ugcaggCuGuGacaggau*a	206	AD00063-AS	u*A*uccuGucacAgCcUgca*u*c	256
AD00064	AD00064-SS	g*g*aguucuGgGuGgacaaca*a	207	AD00064-AS	u*U*guugUccacCcAgAacu*c*c	257
AD00065	AD00065-SS	g*c*aacagcAcCuCagugucu*a	208	AD00065-AS	u*A*gacaCugagGuGcUguu*g*c	258
AD00066	AD00066-SS	g*g*ggucucAcUuUccagca*a	209	AD00066-AS	u*U*ugcuGgaaaGuGaGacc*c*c	259
AD00067	AD00067-SS	g*u*cacuuuCcAgCaaaacuc*a	210	AD00067-AS	u*G*aguuUugcuGgAaAgug*a*c	260

AD00068	AD00068-SS	g*c*cagcaaAaCuCccucaac*a	211	AD00068-AS	u*G*uugaGggagUuUuGcug*g*c	261
AD00069	AD00069-SS	g*a*gcaaaaCuCcCucaacug*a	212	AD00069-AS	u*C*aguuGagggAgUuUugc*u*c	262
AD00070	AD00070-SS	g*g*agcugaAcCuGcaaaaau*a	213	AD00070-AS	u*A*uuuuUgcagGuUcAgcu*c*c	263
AD00071	AD00071-SS	g*c*ugaaccUgCaAaaauga*a	214	AD00071-AS	u*U*cauuuuugCaGgUuca*g*c	264
AD00072	AD00072-SS	g*g*aaccgcCcAuUccuguuu*a	215	AD00072-AS	u*A*aacaGgaauGgGcGguu*c*c	265
AD00073	AD00073-SS	g*a*accgccCaUuCcuguuuug*a	216	AD00073-AS	u*C*aacAggaaUgGgCggu*u*c	266
AD00074	AD00074-SS	g*u*uccuguUuGcUguguaug*a	217	AD00074-AS	u*C*auacAcagcAaAcAgga*a*c	267
AD00075	AD00075-SS	g*c*uguuugCuGuGuaugauc*a	218	AD00075-AS	u*G*aucaUacacAgCaAaca*g*c	268
AD00076	AD00076-SS	g*u*guuugcUgUgUaugauca*a	219	AD00076-AS	u*U*gaucAuacaCaGcAaac*a*c	269
AD00077	AD00077-SS	g*u*ugcuguGuAuGaucaag*a	220	AD00077-AS	u*C*uuugAucauAcAcAgca*a*c	270
AD00078	AD00078-SS	g*u*cccaccUuUuCuucuaau*a	221	AD00078-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUggg*a*c	271
AD00079	AD00079-SS	g*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a	222	AD00079-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg*u*c	272
AD00080	AD00080-SS	g*c*cuuuucUuCuAaugaguc*a	223	AD00080-AS	u*G*acucAuuagAaGaAaag*g*c	273
AD00081	AD00081-SS	g*c*guuucuCcUuGgucuaag*a	224	AD00081-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac*g*c	274
AD00082	AD00082-SS	g*u*uucuccUuGgUcuaagug*a	225	AD00082-AS	u*C*acuuAgaccAaGgAga*a*c	275
AD00083	AD00083-SS	g*g*uuugcuGgGuUuuuuua*a	226	AD00083-AS	u*U*aaaaUaaacCcAgCaaa*c*c	276
AD00084	AD00084-SS	g*u*uugcugGgUuUuuuuag*a	227	AD00084-AS	u*C*uaaaAuaaaCcCaGcaa*a*c	277
AD00085	AD00085-SS	g*u*ugcuggGuUuAuuuuaga*a	228	AD00085-AS	u*U*cuaaAuaaaAcCcAgca*a*c	278
AD00086	AD00086-SS	g*g*gguuuaUuUuAgagaag*a	229	AD00086-AS	u*C*auucUcuaaAaUaAacc*c*c	279
AD00087	AD00087-SS	g*g*guuuauUuUaGagaagug*a	230	AD00087-AS	u*C*cauuCucuaAaAuAaac*c*c	280
AD00088	AD00088-SS	g*g*gcaagaAcCaGuguuuag*a	231	AD00088-AS	u*C*uaaaCacugGuUcUugc*c*c	281
AD00089	AD00089-SS	g*g*caagaaCcAgUguuuagc*a	232	AD00089-AS	u*G*cuaaAcacuGgUuCuug*c*c	282

AD00090	AD00090-SS	g*c*aagaacCaGuGuuuagcg*a	233	AD00090-AS	u*C*gcuaAacacUgGuUcuu*g*c	283
AD00091	AD00091-SS	g*c*uguuccAaAaAgaauucc*a	234	AD00091-AS	u*G*gaauUcuuuUuGgAaca*g*c	284
AD00092	AD00092-SS	g*g*uccaaAaAgAauuccaa*a	235	AD00092-AS	u*U*uggaAuucuUuUuGgaa*c*c	285
AD00093	AD00093-SS	g*u*uccaaaAaGaAuuccaac*a	236	AD00093-AS	u*G*uuggAauucUuUuUgga*a*c	286
AD00094	AD00094-SS	g*c*aaaaagAaUuCcaaccga*a	237	AD00094-AS	u*U*cgguUggaaUuCuUuuu*g*c	287
AD00095	AD00095-SS	g*a*aaaagaAuUcCaaccgac*a	238	AD00095-AS	u*G*ucggUuggaAuUcUuuu*u*c	288
AD00096	AD00096-SS	g*c*aaccgaCcAgCuuguuug*a	239	AD00096-AS	u*C*aacAagcuGgUcGguu*g*c	289
AD00097	AD00097-SS	g*a*accgacCaGcUuguuugu*a	240	AD00097-AS	u*A*caaaCaagcUgGuCggu*u*c	290
AD00098	AD00098-SS	g*g*accagcUuGuUugugaaa*a	241	AD00098-AS	u*U*uucaCaaacAaGcUggu*c*c	291
AD00099	AD00099-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	242	AD00099-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*c	292
AD00100	AD00100-SS	g*c*cagcuGuUuGugaaaca*a	243	AD00100-AS	u*U*guuuCacaaAcAaGcug*g*c	293
AD00101	AD00101-SS	g*u*cauccaCaAuGagaguac*a	244	AD00101-AS	u*G*uacuCucauUgUgGaug*a*c	294
AV01227	AV01227-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	590	AV01227-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	621
AV01228	AV01228-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*u	591	AV01228-AS	a*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	622
AV01229	AV01229-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*c	592	AV01229-AS	g*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	623
AV01230	AV01230-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*g	593	AV01230-AS	c*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	624
AV01231	AV01231-SS	a*g*cuUgUuUgugaaac*a	594	AV01231-AS	u*G*uuucAcaaaCaAg*C*u	625
AV01232	AV01232-SS	c*a*gcuUgUuUgugaaac*a	595	AV01232-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgC*u*g	626
AV01233	AV01233-SS	a*c*agcuUgUuUgugaaac*a	596	AV01233-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*u	627
AV01234	AV01234-SS	u*c*agcuUgUuUgugaaac*a	597	AV01234-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*a	628
AV01235	AV01235-SS	g*c*agcuUgUuUgugaaac*a	598	AV01235-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*c	629
AV01236	AV01236-SS	c*c*agcuUgUuUgugaaac*a	599	AV01236-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*g	630

AV01237	AV01237-SS	a*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	600	AV01237-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*u	631
AV01238	AV01238-SS	u*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	601	AV01238-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*a	632
AV01239	AV01239-SS	g*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	602	AV01239-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*c	633
AV01240	AV01240-SS	c*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	603	AV01240-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*g	634
AV01241	AV01241-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	604	AV01241-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*c	635
AV01242	AV01242-SS	a*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	605	AV01242-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*u	636
AV01243	AV01243-SS	u*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	606	AV01243-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*a	637
AV01244	AV01244-SS	c*g*accagcuUgUuUgugaaac*a	607	AV01244-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggu*c*g	638
AV01245	AV01245-SS	c*c*gaccagcuUgUuUgugaaac*a	608	AV01245-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugguc*g*g	639
AV01246	AV01246-SS	a*c*cgaccagcuUgUuUgugaaac*a	609	AV01246-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucg*g*u	640
AV01247	AV01247-SS	a*a*ccgaccagcuUgUuUgugaaac*a	610	AV01247-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucgg*u*u	641
AV01248	AV01248-SS	c*a*accgaccagcuUgUuUgugaaac*a	611	AV01248-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucggu*u*g	642
AV01249	AV01249-SS	g*a*auuccaaccgaccagcuUgUuUguga aac*a	612	AV01249-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucgguuggaa u*u*c	643
AV01250	AV01250-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	613	AV01250-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggug*u*u	644
AV01251	AV01251-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	614	AV01251-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggug*g*a	645
AV01252	AV01252-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	615	AV01252-AS	u*G*uuu(cUNA)AcaaaCaAgCugg*u*g	646
AV01253	AV01253-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	616	AV01253-AS	u*G*uuuc(aUNA)caaaCaAgCugg*u*g	647
AV01254	AV01254-SS	c*a*ccagcuUGUuugugaaac*a	617	AV01254-AS	u*G*uuuCaacaacaAgCugg*u*g	648
AV01255	AV01255-SS	c*a*ccagcuUgUuUguaaaac*a	618	AV01255-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	649
AV01256	AV01256-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaau*a	619	AV01256-AS	u*A*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	650
AV01257	AV01257-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaa*c*a	620	AV01257-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	651

В таблице 3 приведены последовательности антисмысловой и смысловой нитей некоторых химически модифицированных средств для AGT-специфической RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средства для RNAi, представленные в таблице 3, вводят в клетку и/или организм субъекта. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению субъекту вводят средство для RNAi, имеющее полинуклеотидную последовательность, представленную в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство для RNAi, вводимое субъекту, содержит дуплекс, указанный в первом столбце таблицы 3, и предусматривает модификации последовательности и/или соединения для доставки, показанные в последовательностях смысловой и антисмысловой нитей в третьем и шестом столбцах соответственно той же строки таблицы 3. Эти последовательности применялись в некоторых исследованиях с испытаниями *in vivo*, описанных в других местах в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению последовательности, представленные в таблице 3, могут быть соединены (также упоминается в данном документе как “конъюгированы”) с соединением для доставки, неограничивающим примером которого является GalNAc-содержащее соединение, то есть соединение для доставки, обозначенное как “GLX-n”, присутствует в смысловой нити в третьем столбце таблицы 3. При использовании в данном документе “GLX” означает соединение для доставки “GLS” или “GLO” (“X” может представлять собой “S” или “O”), а GLX-n может представлять собой любое соединение GLS и GLO, которое может быть соединено с 3'- или 5'-концом олигонуклеотида по настоящему изобретению в процессе синтеза. В качестве неограничивающего примера GLX-13 и GLX-14 могут быть соединены с 3'-концом олигонуклеотида по настоящему изобретению в процессе синтеза, и GLX-5 и GLX-15 могут быть соединены с 5'-концом олигонуклеотида по настоящему изобретению в процессе синтеза. В некоторых вариантах осуществления при использовании в данном документе и как показано в таблице 3, “GLX-n” используется для обозначения присоединенного GalNAc-содержащего соединения и представляет собой любое из соединений GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16. В некоторых вариантах реализации GLO-0 представляет собой GalNAc-содержащее соединение, которое было раскрыто в предшествующем уровне техники как подходящее для лигирования, например без ограничения GalNAc-содержащие соединения, подходящие для лигирования, раскрытые в Jayaprakash, et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16958, все из которых приведены в данном документе. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области техники будет иметь необходимые навыки для получения и применения соединений на основе dsRNA по настоящему изобретению с присоединенными соединениями для доставки, в том числе без ограничения следующими: GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, одно из GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-

13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16. Структура каждого из них описана в других местах в данном документе. В первом столбце таблицы 3 приведен AD № дуплекса для дуплекса, присвоенный смысловым и антисмысловым последовательностям в этой строке таблицы. Например, AD № дуплекса AD00052 представляет собой дуплекс, состоящий из смысловой нити AD00052-SS и антисмысловой нити AD00052-AS. В каждой строке таблицы 3 представлены одна смысловая нить и одна антисмысловая нить и раскрыт дуплекс, образованный указанными смысловой и антисмысловой нитями. “SS № смысловой нити” во втором столбце таблицы 3 представляет собой идентификатор, присвоенный смысловой последовательности (включая модификации), показанной в столбце 3 той же строки. “AS № антисмысловой нити” в пятом столбце таблицы 3 представляет собой идентификатор, присвоенный антисмысловой последовательности (включая модификации), показанной в шестом столбце. Идентификатор для определенных соединенных GalNAc-содержащих соединений GLO показан как GLO-0, и следует понимать, что соединение, показанное как GLO-0, может быть замещено другими соединениями, представляющими собой GLO-n или GLS-n, и что полученные соединения также включены в варианты осуществления способов и/или композиций по настоящему изобретению.

В таблице 3 приведены последовательности антисмысловой и смысловой нитей химически модифицированных средств для AGT-специфической RNAi, применяемых для тестирования *in vivo*. Все последовательности показаны в направлении от 5'- к 3'-концу. Эти последовательности применялись в некоторых исследованиях с испытаниями *in vivo*, описанных в других местах в данном документе. Молекулы доставки, используемые в исследованиях *in vivo*, обозначены с помощью “GLO-0” на 3'-конце каждой смысловой нити. Химические модификации представлены следующим образом: верхний регистр - 2'-фтор; нижний регистр - 2'-ОМе; тиофосфат - *; незамкнутая нуклеиновая кислота - UNA (примечание: AD00052, AD00113-AD00260: без UNA; AD00282-AD00301: версия с UNA).

AD № дуплекса	SS № смысловой нити	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	AS № антисмысловой нити	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD00052	AD00052-SS	g*u*cauccaCaAuGagaguac*a(GLO-0)	295	AD00052-AS	u*G*uacuCucauUgUgGaug*a*c	344
AD00113	AD00113-SS	g*u*gggcuuCcGuAuauaugg*a(GLO-0)	296	AD00113-AS	u*C*cauaUauacGgAaGccc*a*c	345
AD00114	AD00114-SS	g*c*uguuugCuGuGuaugauc*a(GLO-0)	297	AD00114-AS	u*G*aucaUacacAgCaAca*g*c	346
AD00115	AD00115-SS	g*g*uuugcuGgGuUuuuuua*a(GLO-0)	298	AD00115-AS	u*U*aaaaUaacCcAgCaaa*c*c	347
AD00116	AD00116-SS	g*c*cagcuuGuUuGugaaaca*a(GLO-0)	299	AD00116-AS	u*U*guuuCacaaAcAaGcug*g*c	348
AD00122	AD00122-SS	g*u*cccaccUuUuCuucuaau*a(GLO-0)	300	AD00122-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUggg*a*c	349
AD00123	AD00123-SS	g*c*cuuuucUuCuAaugaguc*a(GLO-0)	301	AD00123-AS	u*G*acucAuuagAaGaAaag*g*c	350
AD00124	AD00124-SS	g*g*gguuuaUuUuAgagaug*a(GLO-0)	302	AD00124-AS	u*C*auucUcuuaAaUaAacc*c*c	351
AD00125	AD00125-SS	g*g*uuccaaAaAgAauuccaa*a(GLO-0)	303	AD00125-AS	u*U*uggaAuucuUuUuGgaa*c*c	352
AD00126	AD00126-SS	g*u*uccaaaAaGaAuuccaac*a(GLO-0)	304	AD00126-AS	u*G*uuggAauucUuUuUgga*a*c	353
AD00154	AD00154-SS	c*a*uccacaAuGaGaguaccu*a(GLO-0)	305	AD00154-AS	u*A*gguaCucucAuUgUgga*u*g	354
AD00155	AD00155-SS	c*u*ucuuggGcUuCcguaaua*a(GLO-0)	306	AD00155-AS	u*A*uuaCggaaGcCcAaga*a*g	355
AD00156	AD00156-SS	c*a*ugcaggCuGuGacaggau*a(GLO-0)	307	AD00156-AS	u*A*uccuGucacAgCcUgca*u*g	356
AD00157	AD00157-SS	g*c*ugaaccUgCaAaaauuga*a(GLO-0)	308	AD00157-AS	u*U*cauuuuugCaGgUuca*g*c	357

AD00158	AD00158-SS	c*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a(GLO-0)	309	AD00158-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg*u*g	358
AD00159	AD00159-SS	c*c*guuucuCcUuGgucuaag*a(GLO-0)	310	AD00159-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac*g*g	359
AD00160	AD00160-SS	a*c*uguuccAaAaAgaauucc*a(GLO-0)	311	AD00160-AS	u*G*gaauUcuuuUuGgAaca*g*u	360
AD00161	AD00161-SS	c*a*aaaagaAuUcCaaccgac*a(GLO-0)	312	AD00161-AS	u*G*ucggUuggaAuUcUuuu*u*g	361
AD00162	AD00162-SS	c*g*accagcUuGuUugugaaa*a(GLO-0)	313	AD00162-AS	u*U*uucaCaaacAaGcUggg*c*g	362
AD00163	AD00163-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a(GLO-0)	314	AD00163-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*c	363
AD00252	AD00252-SS	u*c*gucaucCaCaAugagagu*a(GLO-0)	315	AD00252-AS	u*A*cucuCauugUgGaUgac*g*a	364
AD00253	AD00253-SS	g*u*ccacaaUgAgAguaccug*a(GLO-0)	316	AD00253-AS	u*C*agguAcucuCaUuGugg*a*c	365
AD00254	AD00254-SS	a*g*ggucucAcUuUccagcaa*a(GLO-0)	317	AD00254-AS	u*U*ugcuGgaaaGuGaGacc*c*u	366
AD00255	AD00255-SS	c*u*guuugcUgUgUaugauca*a(GLO-0)	318	AD00255-AS	u*U*gaucAuacaCaGcAaac*a*g	367
AD00256	AD00256-SS	u*u*ugcuguGuAuGaucaaag*a(GLO-0)	319	AD00256-AS	u*C*uuugAucauAcAcAgca*a*a	368
AD00257	AD00257-SS	g*u*uucuccUuGgUcuaagug*a(GLO-0)	320	AD00257-AS	u*C*acuuAgaccAaGgAga*a*c	369
AD00258	AD00258-SS	g*c*aagaacCaGuGuuuagcg*a(GLO-0)	321	AD00258-AS	u*C*gcuAacacUgGuUcuu*g*c	370
AD00259	AD00259-SS	c*c*aaaaagAaUuCcaaccga*a(GLO-0)	322	AD00259-AS	u*U*cggUggaaUuCuUuuu*g*g	371
AD00260	AD00260-SS	c*a*accgacCaGcUuguuuugu*a(GLO-0)	323	AD00260-AS	u*A*caaaCaagcUgGuCggg*u*g	372
AD00282	AD00282-SS	g*u*cccaccUuUuCuucuaau*a(GLO-0)	324	AD00282-AS	u*A*uuAg(aUNA)agaaAaGgUg gg*a*c	373
AD00283	AD00283-SS	g*u*uccaaaAaGaAuuccaac*a(GLO-0)	325	AD00283-AS	u*G*uuGg(aUNA)auucUuUuUg ga*a*c	374
AD00284	AD00284-SS	g*c*cuuuucUuCuAaugaguc*a(GLO-0)	326	AD00284-AS	u*G*acUc(aUNA)uuagAaGaAaa g*g*c	375
AD00285	AD00285-SS	g*c*cagcuuGuUuGugaaaca*a(GLO-0)	327	AD00285-AS	u*U*guUu(cUNA)acaaAcAaGcu	376

					g*g*c	
AD00286	AD00286-SS	g*g*uuccaaAaAgAauuccaa*a(GLO-0)	328	AD00286-AS	u*U*ugGa(aUNA)uucuUuUuGg aa*c*c	377
AD00287	AD00287-SS	g*g*uuugcuGgGuUuauuuua*a(GLO-0)	329	AD00287-AS	u*U*aaAa(uUNA)aaacCcAgCaa a*c*c	378
AD00288	AD00288-SS	c*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a(GLO-0)	330	AD00288-AS	u*A*cuCa(uUNA)uagaAgAaAa gg*u*g	379
AD00289	AD00289-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a(GLO-0)	331	AD00289-AS	u*G*uuUc(aUNA)caaaCaAgCug g*u*c	380
AD00290	AD00290-SS	c*c*guuucuCcUuGgucuaag*a(GLO-0)	332	AD00290-AS	u*C*uuAg(aUNA)ccaaGgAgAaa c*g*g	381
AD00291	AD00291-SS	c*g*accagcUuGuUugugaaa*a(GLO-0)	333	AD00291-AS	u*U*uuCa(cUNA)aaacAaGcUgg u*c*g	382
AD00292	AD00292-SS	c*a*aaaagaAuUcCaaccgac*a(GLO-0)	334	AD00292-AS	u*G*ucGg(uUNA)uggaAuUcUu uu*u*g	383
AD00293	AD00293-SS	u*c*gucaucCaCaAugagagu*a(GLO-0)	335	AD00293-AS	u*A*cuCu(cUNA)auugUgGaUg ac*g*a	384
AD00294	AD00294-SS	g*u*ccacaaUgAgAguaccug*a(GLO-0)	336	AD00294-AS	u*C*agGu(aUNA)cucuCaUuGu gg*a*c	385
AD00295	AD00295-SS	a*g*ggucucAcUuUccagcaa*a(GLO-0)	337	AD00295-AS	u*U*ugCu(gUNA)gaaaGuGaGa cc*c*u	386
AD00296	AD00296-SS	c*u*guuugcUgUgUaugauca*a(GLO-0)	338	AD00296-AS	u*U*gaUc(aUNA)uacaCaGcAaa	387

					c*a*g	
AD00297	AD00297-SS	u*u*ugcuguGuAuGaucaaag*a(GLO-0)	339	AD00297-AS	u*C*uuUg(aUNA)ucauAcAcAg ca*a*a	388
AD00298	AD00298-SS	g*u*uucuccUuGgUcuaagug*a(GLO-0)	340	AD00298-AS	u*C*acUu(aUNA)gaccAaGgAga a*a*c	389
AD00299	AD00299-SS	g*c*aagaacCaGuGuuuagcg*a(GLO-0)	341	AD00299-AS	u*C*gcUa(aUNA)acacUgGuUcu u*g*c	390
AD00300	AD00300-SS	c*c*aaaaagAaUuCcaaccga*a(GLO-0)	342	AD00300-AS	u*U*cgGu(uUNA)ggaaUuCuUu uu*g*g	391
AD00301	AD00301-SS	c*a*accgacCaGcUuguuugu*a(GLO-0)	343	AD00301-AS	u*A*caAa(cUNA)aagcUgGuCgg u*u*g	392
AD00302	AD00302-SS	c*c*aaccgaCcAgCuuguuug*a(GLO-0)	524	AD00302-AS	u*C*aaAc(aUNA)agcuggUcGgu u*g*g	525

В таблице 4 приведены последовательности антисмысловой и смысловой нитей определенных химически модифицированных средств для AGT-специфической RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению субъекту вводят средство для RNAi, имеющее полинуклеотидную последовательность, представленную в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство для RNAi, вводимое субъекту, содержит дуплекс, обозначенный в строке первого столбца таблицы 4, и предусматривает модификации последовательности и/или соединения для доставки, показанные в последовательностях смысловой и антисмысловой нитей в той же строке в третьем и шестом столбцах таблицы 4. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению последовательности, представленные в таблице 4, могут быть соединены с соединением, способным обеспечивать доставку средства для RNAi к клеткам и/или тканям субъекта. Неограничивающими примерами соединений для доставки, применимых в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, являются GalNAc-содержащие соединения. В таблице 4 термин “GLX-n” относится к соединениям, содержащим GalNAc в показанной смысловой нити. Например, термины “GLO-0” и “GLS-5” обозначают разные GalNAc-содержащие соединения, присоединенные к смысловой нити. Следует понимать, что соединение, показанное как GLO-0, может быть замещено другим соединением из соединений GLO-n или GLS-n, и что полученные соединения также предусмотрены в вариантах осуществления способов и/или композиций по настоящему изобретению. Аналогично, соединение, показанное как GLS-5, также может быть замещено другим соединением из соединений GLS-n или GLO-n, и полученные соединения предусмотрены в вариантах осуществления способов и/или композиций по настоящему изобретению. В таблице 4 соединение GLX-n, используемое для обозначения присоединенного GalNAc-содержащего соединения, представляет собой соединение GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16, структура каждого из которых представлена в других местах в данном документе. В первом столбце таблицы 4 представлен AD № дуплекса, соответствующий дуплексу, показанному в таблице 3. AD № дуплекса обозначает последовательность дуплекса, соответствующую таковой в таблице 3, указывая на то, что смысловые, антисмысловые последовательности и последовательности дуплекса в таблице 4 идентичны последовательности оснований с тем же AD № дуплекса в таблице 3, но последовательности и дуплексы в таблице 4 имеют различные химические модификации и/или соединения для доставки по сравнению с соответствующими последовательностями и дуплексами, представленными в таблице 3. Например, как показано в таблице 4, последовательности AD00113-1-SS и AD00113-1-AS и их дуплекс под AD № AD00113-1 соответственно имеют ту же последовательность оснований, что и AD00113-SS (смысловая), AD00113-AS (антисмысловая) и двухнитевая структура под AD № AD00113, показанные в таблице 3, но с химическими модификациями и/или

соединениями для доставки, как указано в каждой таблице. В первом столбце таблицы 4 указан номер, представляющий собой AD № дуплекса; дуплексы, обозначенные номерами в каждой строке, содержат смысловую и антисмысловую нити, показанные в третьем и шестом столбцах соответственно в той же строке, и предусматривают модификации, и каждый из них содержит соединение для доставки GLO или GLS, присоединенное к 3'- или 5'-концу смысловой нити.

В таблице 4 представлены последовательности антисмысловой и смысловой нитей химически модифицированных средств для AGT-специфической RNAi. Эти последовательности применялись в определенных исследованиях *in vivo*, описанных в других местах в данном документе. Все последовательности показаны в направлении от 5'- к 3'-концу. Химические модификации указаны следующим образом: верхний регистр - 2'-фтор; нижний регистр - 2'-ОМе; тиофосфат - *; Invab=инвертированный остаток с удаленным азотистым основанием.

AD № дуплекса	SS № смысловой нити	Последовательность смысловой нити 5'-> 3'	SEQ ID NO	AS № антисмысловой нити	Последовательность антисмысловой нити 5'->3'	SEQ ID NO
AD00113-1	AD00113-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gugggcuuCcGuAuauaugga*(Invab)	393	AD00113-1-AS	u*C*cauaUauacGgAaGccc*a*c	456
AD00114-1	AD00114-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcuguuugCuGuGuaugauca*(Invab)	394	AD00114-1-AS	u*G*aucaUacacAgCaAaca*g*c	457
AD00115-1	AD00115-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gguuugcuGgGuUuuuuuaa*(Invab)	395	AD00115-1-AS	u*U*aaaaUaaacCcAgCaaa*c*c	458
AD00116-1	AD00116-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccagcuuGuUuGugaaaca*(Invab)	396	AD00116-1-AS	u*U*guuuCacaaAcAaGcug*g*c	459
AD00122-1	AD00122-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guccaccUuUuCuucuaaua*(Invab)	397	AD00122-1-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUggg*a*c	460
AD00123-1	AD00123-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccuuuucUuCuAaugaguca*(Invab)	398	AD00123-1-AS	u*G*acucAuuagAaGaAaag*g*c	461
AD00124-1	AD00124-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gggguuuaUuUuAgagaauga*(Invab)	399	AD00124-1-AS	u*C*auucUcuuaAaUaAacc*c*c	462
AD00125-1	AD00125-1-SS	(GLS-	400	AD00125-1-AS	u*U*uggaAuucuUuUuGgaa*c*c	463

	SS	5)*(Invab)*gguuccaaAaAgAauuccaaa*(Invab)				
AD00126-1	AD00126-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuccaaaAaGaAuuccaaca*(Invab)	401	AD00126-1-AS	u*G*uuggAauucUuUuUgga*a*c	464
AD00154-1	AD00154-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cauccacaAuGaGaguaccua*(Invab)	402	AD00154-1-AS	u*A*gguaCucucAuUgUgga*u*g	465
AD00155-1	AD00155-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cuucuuggGcUuCcguaauau*(Invab)	403	AD00155-1-AS	u*A*uauaCggaaGcCcAaga*a*g	466
AD00156-1	AD00156-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caugcaggCuGuGacaggau*(Invab)	404	AD00156-1-AS	u*A*uccuGucacAgCcUgca*u*g	467
AD00157-1	AD00157-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcugaaccUgCaAaaauugaa*(Invab)	405	AD00157-1-AS	u*U*caauUuuugCaGgUuca*g*c	468
AD00160-1	AD00160-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*acuguuccAaAaAgaauucca*(Invab)	406	AD00160-1-AS	u*G*gaauUcuuuUuGgAaca*g*u	469
AD00161-1	AD00161-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaaaagaAuUcCaaccgaca*(Invab)	407	AD00161-1-AS	u*G*ucggUuggaAuUcUuuu*u*g	470
AD00162-1	AD00162-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cgaccagcUuGuUugugaaaa*(Invab)	408	AD00162-1-AS	u*U*uucaCaaacAaGcUggu*c*g	471
AD00252-1	AD00252-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ucguaucCaCaAugagagua*(Invab)	409	AD00252-1-AS	u*A*cucuCauugUgGaUgac*g*a	472
AD00253-1	AD00253-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guccacaaUgAgAguaccuga*(Invab)	410	AD00253-1-AS	u*C*agguAcucuCaUuGugg*a*c	473
AD00254-1	AD00254-1-	(GLS-	411	AD00254-1-AS	u*U*ugcuGgaaaGuGaGacc*c*u	474

	SS	5)*(Invab)*aggucucAcUuUccagcaaa*(Invab)				
AD00255-1	AD00255-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cuguuugcUgUgUaugaucaa*(Invab)	412	AD00255-1-AS	u*U*gaucAuacaCaGcAaac*a*g	475
AD00256-1	AD00256-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*uuugcuguGuAuGaucaaa*(Invab)	413	AD00256-1-AS	u*C*uuugAucauAcAcAgca*a*a	476
AD00257-1	AD00257-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuucuccUuGgUcuaaguga*(Invab)	414	AD00257-1-AS	u*C*acuuAgaccAaGgAgaa*a*c	477
AD00258-1	AD00258-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcaagaacCaGuGuuuagcga*(Invab)	415	AD00258-1-AS	u*C*gcuaAacacUgGuUcuu*g*c	478
AD00259-1	AD00259-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccaaaaagAaUuCcaaccgaa*(Invab)	416	AD00259-1-AS	u*U*cgguUggaaUuCuUuuu*g*g	479
AD00260-1	AD00260-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaccgacCaGcUuguuugua*(Invab)	417	AD00260-1-AS	u*A*caaaCaagcUgGuCggu*u*g	480
AD00282-1	AD00282-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gucccaccUuUuCuucuaaau*(Invab)	418	AD00282-1-AS	u*A*uuAg(aUNA)agaaAaGgUggg*a*c	481
AD00283-1	AD00283-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuccaaaAaGaAuuccaaca*(Invab)	419	AD00283-1-AS	u*G*uuGg(aUNA)auucUuUuUgga*a*c	482
AD00284-1	AD00284-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccuuuucUuCuAaugaguca*(Invab)	420	AD00284-1-AS	u*G*acUc(aUNA)uuagAaGaAaag*g*c	483
AD00285-1	AD00285-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccagcuuGuUuGugaaacaa*(Invab)	421	AD00285-1-AS	u*U*guUu(cUNA)acaaAcAaGcug*g*c	484
AD00286-1	AD00286-1-	(GLS-	422	AD00286-1-AS	u*U*ugGa(aUNA)uucuUuUuGgaa	485

	SS	5)*(Invab)*gguuccaaAaAgAauuccaaa*(Invab)			*c*c	
AD00287-1	AD00287-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gguugcuGgGuUuauuuuaa*(Invab)	423	AD00287-1-AS	u*U*aaAa(uUNA)aaacCcAgCaaa* c*c	486
AD00288-1	AD00288-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caccuuuuCuUcUaaugagua*(Invab)	424	AD00288-1-AS	u*A*cuCa(uUNA)uagaAgAaAagg* u*g	487
AD00289-1	AD00289-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	425	AD00289-1-AS	u*G*uuUc(aUNA)caaaCaAgCugg* u*c	488
AD00290-1	AD00290-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccguuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	426	AD00290-1-AS	u*C*uuAg(aUNA)ccaaGgAgAaac* g*g	489
AD00291-1	AD00291-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cgaccagcUuGuUugugaaaa*(Invab)	427	AD00291-1-AS	u*U*uuCa(cUNA)aaacAaGcUgg* c*g	490
AD00292-1	AD00292-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaaaagaAuUcCaaccgaca*(Invab)	428	AD00292-1-AS	u*G*ucGg(uUNA)uggaAuUcUuuu *u*g	491
AD00293-1	AD00293-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ucgucaucCaCaAugagagua*(Invab)	429	AD00293-1-AS	u*A*cuCu(cUNA)auugUgGaUgac* g*a	492
AD00294-1	AD00294-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guccacaaUgAgAguaccuga*(Invab)	430	AD00294-1-AS	u*C*agGu(aUNA)cucuCaUuGugg* a*c	493
AD00295-1	AD00295-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*aggucucAcUuUccagcaaa*(Invab)	431	AD00295-1-AS	u*U*ugCu(gUNA)gaaaGuGaGacc* c*u	494
AD00296-1	AD00296-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cuguuugcUgUgUaugaucaa*(Invab)	432	AD00296-1-AS	u*U*gaUc(aUNA)uacaCaGcAaac* a*g	495
AD00297-1	AD00297-1-	(GLS-	433	AD00297-1-AS	u*C*uuUg(aUNA)ucauAcAcAgca*	496

	SS	5)*(Invab)*uuugcuguGuAuGaucaaaga*(Invab)			a*a	
AD00298-1	AD00298-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuucuccUuGgUcuaaguga*(Invab)	434	AD00298-1-AS	u*C*acUu(aUNA)gaccAaGgAga*a*c	497
AD00299-1	AD00299-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcaagaacCaGuGuuuagcga*(Invab)	435	AD00299-1-AS	u*C*gcUa(aUNA)acacUgGuUcuu*g*c	498
AD00301-1	AD00301-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaccgacCaGcUuguuuugua*(Invab)	436	AD00301-1-AS	u*A*caAa(cUNA)aagcUgGuCggu*u*g	499
AD00302-1	AD00302-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccaaccgaCcAgCuuguuuuga*(Invab)	437	AD00302-1-AS	u*C*aaAc(aUNA)agcuggUcGguu*g*g	500
AD00158-1	AD00158-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaccuuuuCuUcUaaugagua*(Invab)	438	AD00158-1-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg*u*c	501
AD00158-2	AD00158-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaccuuucUuUcUagcgagua*(Invab)	439	AD00158-2-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg*u*c	502
AD00158-3	AD00158-3-SS	g*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a(GLO-0)	440	AD00158-3-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg*u*c	503
AD00163-1	AD00163-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	441	AD00163-1-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	504
AD00163-2	AD00163-2-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a(GLO-0)	442	AD00163-2-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	505
AD00159-1	AD00159-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcuuuucCcuUgucuaaga*(Invab)	443	AD00159-1-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac*g*c	506
AD00159-2	AD00159-2-SS	g*c*guuuucCcuUgucuaag*a(GLO-0)	444	AD00159-2-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac*g*c	507

	SS					
AD00300-1	AD00300-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcaaaaagAaUuCcaaccgaa*(Invab)	445	AD00300-1-AS	u*U*cgGu(uUNA)ggaaUuCuUuuu *g*c	508
AD00158-19-1	AD00158-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccuuuuCuUcUaaugagua*(Invab)	446	AD00158-19-1-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAa*g*g	509
AD00163-19-1	AD00163-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	447	AD00163-19-1-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*g	510
AD00159-19-1	AD00159-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	448	AD00159-19-1-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAa*a*c	511
AD00300-19-1	AD00300-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*aaaaagAaUuCcaaccgaa*(Invab)	449	AD00300-19-1-AS	u*U*cgGu(uUNA)ggaaUuCuUu*u *u	512
AD00122-19-1	AD00122-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cccaccUuUuCuucuaaua*(Invab)	450	AD00122-19-1-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUg*g*g	513
AD00158-19-2	AD00158-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccuuuuCuUcUaaugaguu*(Invab)	451	AD00158-19-2-AS	a*A*cucaUuagaAgAaAa*g*g	514
AD00163-19-2	AD00163-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccagcuUgUuUgugaaacu*(Invab)	452	AD00163-19-2-AS	a*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*g	515
AD00159-19-2	AD00159-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuucuCcUuGgucuaagu*(Invab)	453	AD00159-19-2-AS	a*C*uuagAccaaGgAgAa*a*c	516
AD00300-19-2	AD00300-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*aaaaagAaUuCcaaccgau*(Invab)	454	AD00300-19-2-AS	a*U*cgGu(uUNA)ggaaUuCuUu*u *u	517
AD00122-19-2	AD00122-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*cccaccUuUuCuucuaauu*(Invab)	455	AD00122-19-2-AS	a*A*uuagAagaaAaGgUg*g*g	518

19-2	2-SS					
AD00163-3	AD00163-3-SS	(GLS-15)*(Invab)*caccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	526	AD00163-3-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	527
AD00159-3	AD00159-3-SS	(GLS-15)*(Invab)*gcguuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	654	AD00159-3-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac*g*c	655

Ошибочное спаривание

Специалистам в данной области техники известно, что ошибочные спаривания допустимы с точки зрения эффективности dsRNA, особенно если они находятся в пределах терминальной области dsRNA. Некоторые случаи ошибочного спаривания переносятся лучше, такие как случаи ошибочного спаривания с нестрогими соответствующими парами оснований G:U и A:C (Du et al., A systematic analysis of silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res.*, 21 марта 2005 г.;33(5):1671-7. Doi: 10.1093/nar/gki312. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(11):3698). В некоторых вариантах осуществления способов и соединений по настоящему изобретению средство на основе AGT-специфической dsRNA может характеризоваться наличием одного или нескольких положений с ошибочным спариванием с последовательностью-мишенью в составе AGT. В некоторых вариантах осуществления средства на основе AGT-специфической dsRNA не характеризуются наличием положений с ошибочным спариванием. В определенных вариантах осуществления средства на основе AGT-специфической dsRNA характеризуются наличием не более 1 положения с ошибочным спариванием. В некоторых вариантах осуществления средства на основе AGT-специфической dsRNA характеризуются наличием не более 2 положений с ошибочным спариванием. В определенных вариантах осуществления средства на основе AGT-специфической dsRNA характеризуются наличием не более 3 положений с ошибочным спариванием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антисмысловая нить средства на основе AGT-специфической dsRNA характеризуется наличием положения с ошибочным спариванием с последовательностью-мишенью в составе AGT, которое не расположено в центре области комплементарности. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить средства на основе AGT-специфической dsRNA характеризуется наличием 1, 2, 3, 4 или больше положений с ошибочным спариванием, расположенных в пределах последних 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от одного или обоих 5'- или 3'-концов области комплементарности. Описанные в данном документе способы и/или известные в данной области техники способы можно применять для определения того, является ли средство на основе AGT-специфической dsRNA, характеризующееся наличием положения с ошибочным спариванием с последовательностью-мишенью в составе AGT, эффективным в подавлении экспрессии гена AGT.

Комплементарность

При использовании в данном документе, если не указано иное, термин “комплементарность/комплементарный” при использовании для описания отношения первой нуклеотидной последовательности (например, смысловой нити средства на основе AGT-специфической dsRNA или мРНК AGT, в отношении которой осуществляется нацеливание) ко второй нуклеотидной последовательности (например, антисмысловой нити средства на основе AGT-специфической dsRNA или одностороннего антисмыслового полинуклеотида) относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться

[образовывать водородные связи между парами оснований в физиологических условиях организма млекопитающего (или аналогичных условиях *in vitro*)] с олигонуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, и образовывать двойную спираль или дуплексную структуру при определенных условиях. Могут применяться и другие условия, например, физиологически значимые условия, которые могут встречаться в живых организмах. Специалист в данной области техники сможет определить набор условий, наиболее подходящих для проверки комплементарности двух последовательностей, исходя из конечного применения гибридизированных нуклеотидов. Комплементарные последовательности предусматривают пары оснований по Уотсону-Крику или пары оснований, отличные от таковых по Уотсону-Крику, и предусматривают природные или модифицированные нуклеотиды или нуклеотидные миметики по меньшей мере в той степени, в которой это не препятствует выполнению вышеуказанных требований к гибридации. Идентичность или комплементарность последовательностей не зависят от модификации.

Например, комплементарная последовательность в составе AGT-специфической dsRNA, как описано в данном документе, предусматривает спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В данном документе такие последовательности могут быть указаны как являющиеся “полностью комплементарными” друг другу. Следует понимать, что в вариантах осуществления, где два олигонуклеотида сконструированы таким образом, что при гибридации образуют один или несколько односторонних липких концов, такие липкие концы не рассматриваются в данном документе как положения с ошибочным спариванием при определении на основе комплементарности. Например, средство на основе AGT-специфической dsRNA, содержащее один олигонуклеотид длиной 19 нуклеотидов и другой олигонуклеотид длиной 20 нуклеотидов, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 19 нуклеотидов, полностью комплементарную более короткому олигонуклеотиду, может для целей, описанных в данном документе, именоваться “полностью комплементарным”. Таким образом, при использовании в данном документе “полностью комплементарный” означает, что все (100%) основания в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизироваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в данном документе термин “по сути комплементарный” означает, что в гибридных парах последовательностей нуклеиновых оснований по меньшей мере приблизительно 85% (но не все) оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизироваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Если две последовательности

содержат одну или несколько неканонических пар оснований в гибридизированном состоянии, например по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 неканонических пар оснований, термин “по сути комплементарный” может использоваться в отношении дуплекса длиной до 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований (п. о.), образованного первой последовательностью по отношению ко второй, при сохранении способности гибридизоваться в условиях, наиболее подходящих для его конечного применения, например подавления экспрессии гена AGT посредством пути RISC. Термин “частично комплементарный” может использоваться в данном документе для обозначения гибридизированной пары последовательностей нуклеиновых оснований, в которой по меньшей мере 75% (но не все) оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления “частично комплементарный” означает, что по меньшей мере 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% из оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будет гибридизоваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида.

Термины “комплементарный”, “полностью комплементарный”, “по сути комплементарный” и “частично комплементарный” могут использоваться в данном документе для обозначения совпадения оснований между смысловой и антисмысловой нитью средства на основе dsRNA, между антисмысловой нитью средства на основе dsRNA и последовательностью мРНК AGT, являющейся мишенью, или между однонитевым антисмысловым олигонуклеотидом и последовательностью мРНК AGT, являющейся мишенью. Следует понимать, что термин “антисмысловая нить средства на основе AGT-специфической dsRNA” может относиться к той же последовательности “средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида”.

При использовании в данном документе термины “по сути идентичный” или “существенная идентичность” применительно к последовательности нуклеиновой кислоты означают, что последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 85% или большей идентичностью последовательности по отношению к эталонной последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. Процентную долю идентичности последовательностей определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения. Процентную долю рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречается одно и то же основание нуклеиновой кислоты, с получением таким образом количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения полученного результата на

100, с получением процента идентичности последовательностей. Изобретения, раскрытые в данном документе, включают нуклеотидные последовательности, которые по сути идентичны тем, которые раскрыты в данном документе (например, в таблицах 1-5). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность идентична или идентична на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности, раскрытой в данном документе (например, в таблицах 1-4).

При использовании в данном документе термин “нить, содержащая последовательность” относится к олигонуклеотиду, содержащему нить нуклеотидов, описываемую последовательностью, указанной с использованием стандартной номенклатуры для нуклеотидов. При использовании в данном документе термин “двухнитевая РНК” или “dsRNA” означает последовательность, предусматривающую молекулу РНК или комплекс молекул для RNAi, содержащие гибридизованную дуплексную область, содержащую две антипараллельные и по сути или полностью комплементарные нити нуклеиновой кислоты, которые обозначаются как имеющие “смысловую” и “антисмысловую” ориентацию относительно РНК АГТ, являющейся мишенью. Дуплексная область может характеризоваться любой необходимой длиной, которая обеспечивает специфическое разрушение РНК АГТ, являющейся мишенью, посредством пути RISC, но обычно ее длина составляет от 9 до 30 пар оснований, например 15-30 пар оснований. Если рассматривать дуплекс от 9 до 30 пар оснований, то дуплекс может быть любой длины в этом диапазоне, например 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований, а также любом поддиапазоне в этом диапазоне, в том числе без ограничения 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований; 15-23 пары оснований, 15-22 пары оснований, 15-21 пара оснований, 15-20 пар оснований, 15-19 пар оснований, 15-18 пар оснований, 15-17 пар оснований, 18-30 пар оснований, 18-26 пар оснований, 18-23 пары оснований, 18-22 пары оснований, 18-21 пара оснований, 18-20 пар оснований, 19-30 пар оснований, 19-26 пар оснований, 19-23 пары оснований, 19-22 пары оснований, 19-21 пара оснований, 19-20 пар оснований, 20-30 пар оснований, 20-26 пар оснований, 20-25 пар оснований, 20-24 пары оснований, 20-23 пары оснований, 20-22 пары оснований, 20-21 пара оснований, 21-30 пар оснований, 21-26 пар оснований, 21-25 пар оснований, 21-24 пары оснований, 21-23 пары оснований или 21-22 пары оснований. Длина средств на основе АГТ-специфической dsRNA, которые получают в клетке в результате обработки ферментом дайсер и аналогичными ферментами, обычно составляет 19-22 пары оснований. Одна из нитей дуплексной области средства на основе АГТ-специфической dsDNA содержит последовательность, которая по сути комплементарна области РНК АГТ, являющейся мишенью. Две нити, образующие дуплексную структуру, могут происходить из одной молекулы РНК, имеющей по меньшей мере одну самокомплементарную область, или могут быть образованы из двух или нескольких отдельных молекул РНК. В случае, если дуплексная область образована из одной молекулы, молекула может иметь дуплексную структуру, образованную между одной нитью на 3'-

конце и другой нитью на соответствующем 5'-конце одонитевой цепи нуклеотидов (в данном документе именуемой “шпилечной петлей”). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конфигурация шпильки включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше неспаренных нуклеотидов. Если две по сути комплементарные нити средства на основе АГТ-специфической dsRNA состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не должны быть ковалентно связаны, однако этот вариант возможен. Если две нити ковалентно соединены с помощью средств, отличных от шпилечной петли, соединительная структура называется “линкером”. Термин “siRNA” также используется в данном документе для обозначения средства на основе dsRNA, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе АГТ-специфической dsRNA могут содержать смысловые и антисмысловые последовательности, которые имеют неспаренные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов на одном или обоих концах средства на основе dsRNA. Концы без неспаренных нуклеотидов называются “тупыми концами” и не содержат нуклеотидных липких концов. Если оба конца средства на основе dsRNA являются тупыми, говорят, что такая dsRNA характеризуется наличием “тупых концов”. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первый конец средства на основе dsRNA является тупым, в некоторых вариантах осуществления второй конец средства на основе dsRNA является тупым, и в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения оба конца средства на основе АГТ-специфической dsRNA являются тупыми.

В некоторых вариантах осуществления средств на основе dsRNA по настоящему изобретению, dsRNA не содержит одного или двух тупых концов. В этом случае на конце нити средства на основе dsRNA имеется по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити, или наоборот, возникает нуклеотидный липкий конец. dsRNA может содержать липкие концы из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более нуклеотидов. Нуклеотидные липкие концы могут содержать аналоги нуклеотидов/нуклеозидов, включая дезоксинуклеотиды/нуклеозиды, или состоять из них. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления нуклеотидные липкие концы находятся на смысловой нити средства на основе dsRNA, на антисмысловой нити средства на основе dsRNA или на обоих концах средства на основе dsRNA, и нуклеотид(нуклеотиды) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити средства на основе dsRNA. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько нуклеотидов в липком конце замещены нуклеозидтиофосфатом.

При использовании в данном документе термин “антисмысловая нить” или “направляющая нить” относится к нити средства на основе АГТ-специфической dsRNA, которая содержит область, которая является по сути комплементарной последовательности-мишени АГТ. При использовании в данном документе термин

“смысловая нить” или “сопровождающая нить” относится к нити средства на основе AGT-специфической dsRNA, которая содержит область, которая является по сути комплементарной области антисмысловой нити средства на основе AGT-специфической dsRNA.

Модификации

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК средства для AGT-специфической RNAi химически модифицируют для достижения повышенной стабильности и/или одного или нескольких других полезных свойств. Нуклеиновые кислоты в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения могут быть синтезированы и/или модифицированы посредством способов, хорошо известных в данной области техники, см. например, работу "Current protocols in Nucleic Acid Chemistry", Beaucage, SL et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, США, которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки. Модификации, которые могут присутствовать в определенных вариантах осуществления в средствах на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению, включают, например, следующее: (а) концевые модификации, такие как 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгация, обратные связи и т. д.), 3'-концевые модификации (конъюгация, нуклеотиды ДНК, обратные связи и т. д.); (b) модификации оснований, например замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, образующими пары с расширенным пулом партнеров, отсутствие оснований (нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями) или конъюгированные основания; (с) модификации сахаров (например, в положении 2' или 4') или замену сахаров; и (d) модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений на основе РНК, применимых в определенных вариантах осуществления средств на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и AGT-специфических смысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не имеющие естественных межнуклеозидных связей. В качестве неограничивающего примера, РНК с модификациями остова может не содержать атомов фосфора в остове. РНК, не содержащая атома фосфора в своем межнуклеозидном остове, может называться олигонуклеозидом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная РНК содержит атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Следует понимать, что термины “молекула РНК”, “РНК” или “молекула рибонуклеиновой кислоты” охватывают не только молекулы РНК, экспрессируемые или встречающиеся в природе, но также аналоги и производные РНК, содержащие один или несколько рибонуклеотидных/рибонуклеозидных аналогов или производных, представленных в данном документе, как описано или известно в данной области техники. Термины “рибонуклеозид” и “рибонуклеотид” могут применяться в данном документе взаимозаменяемо. Молекулы РНК могут быть модифицированы в структуре нуклеинового

основания или в структуре рибозофосфатного остова (например, как описано ниже в данном документе), и молекулы, содержащие рибонуклеозидные аналоги или производные, должны сохранять способность образовывать дуплексы. В качестве неограничивающих примеров, молекула РНК может также содержать по меньшей мере один модифицированный рибонуклеозид, в том числе без ограничения 2'-О-метилмодифицированные нуклеозиды, нуклеозиды, содержащие 5'-фосфоротиоатную группу, концевые нуклеозиды, соединенные с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, замкнутые нуклеозиды, нуклеозиды с удаленными азотистыми основаниями, 2'-дезоксид-2'-фтормодифицированные нуклеозиды, 2'-аминомодифицированные нуклеозиды, 2'-алкилмодифицированные нуклеозиды, морфолинонуклеозиды, фосфорамидаты или нуклеозиды, содержащие не встречающиеся в природе основания, или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула РНК содержит следующее количество модифицированных рибонуклеозидов: по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или до полной длины рибонуклеозидов молекулы средства на основе АГТ-специфической dsRNA. Модификации не обязательно должны быть одинаковыми для каждого из множества модифицированных рибонуклеозидов в такой молекуле РНК.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе dsRNA, АГТ-специфические антисмысловые полинуклеотиды и/или АГТ-специфические смысловые полинуклеотиды могут содержать один или несколько независимо выбранных модифицированных нуклеотидов и/или одну или несколько независимо выбранных связей, отличных от фосфодиэфирных. При использовании в данном документе термин “независимо выбранный” при его использовании в отношении выбранных элементов, таких как модифицированные нуклеотиды, связи, отличные от фосфодиэфирных, и т. д., означает, что два или больше выбранных элементов могут быть, но не обязательно, идентичными друг другу. При использовании в данном документе “нуклеотидное основание”, “нуклеотид” или “нуклеиновое основание” представляют собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является стандартным компонентом всех нуклеиновых кислот и предусматривает основания, образующие нуклеотиды: аденин (a), гуанин (g), цитозин (c), тимин (t) и урацил (u). Нуклеиновые основания могут быть дополнительно модифицированы таким образом, что будут включать без ограничения универсальные основания, гидрофобные основания, основания с неизбирательным связыванием, основания с увеличенным размером и фторированные основания. Термин “рибонуклеотид” или “нуклеотид” может использоваться в данном документе для обозначения немодифицированных нуклеотидов, модифицированных нуклеотидов или альтернативных фрагментов. Специалистам в данной области техники будет понятно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, который содержит нуклеотид, несущий такой замещающий фрагмент.

В одном из вариантов осуществления модифицированные РНК, которые

предполагается применять в описанных в данном документе способах и композициях, представляют собой пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), способные образовывать необходимую дуплексную структуру и обеспечивать или опосредовать специфическое разрушение РНК-мишени посредством пути RISC. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средства для AGT-специфической РНК-интерференции содержат однонитевые РНК, которые взаимодействуют с последовательностью РНК AGT, являющейся мишенью, с обеспечением направления расщепления РНК AGT, являющейся мишенью.

Модифицированные остовы РНК могут содержать, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты (в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты), фосфинаты, фосфорамидаты (в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты), тиофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты (с нормальными 3'-5'-связями, а также их аналоги с 2'-5'-связями и с инвертированной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных единиц соединены в формате 3'-5' - 5'-3' или 2'-5' - 5'-2'). Также включены различные соли, смешанные соли и свободные формы кислот. Способы получения фосфорсодержащих связей широко практикуются в данной области техники, и такие способы можно применять для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA, определенных модифицированных AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или определенных модифицированных AGT-специфических смысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

Модифицированные остовы РНК, не содержащие атома фосфора в их составе, характеризуются структурами, образованными из короткоцепочечных алкильных или циклоалкильных межнуклеозидных связей, смешанных гетероатомов и алкильных или циклоалкильных межнуклеозидных связей, или одной или нескольких короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических межнуклеозидных связей. К ним относятся таковые с морфолиновыми связями (образованными частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; метилацетиловые и тиометилацетиловые остовы; метиленметацетиловые и тиометилацетиловые остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие части со смешанными N-, O-, S- и CH₂-компонентами. Способы получения модифицированных остовов РНК, не содержащих атомов фосфора, широко практикуются в данной области техники, и такие способы могут применяться для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA, определенных модифицированных AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или определенных модифицированных AGT-специфических смысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения миметики РНК

включены в AGT-специфические dsRNA, AGT-специфические антисмысловые полинуклеотиды и/или AGT-специфические смысловые полинуклеотиды, как, например без ограничения, посредством применения новых групп вместо сахара и межнуклеозидной связи (т. е. остова) нуклеотидных звеньев. В таких вариантах осуществления звенья, представляющие собой основания, сохраняются для обеспечения гибридизации с соответствующим соединением-мишенью в составе нуклеиновой кислотой AGT. Одно из таких олигомерных соединений, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК замещен амидсодержащим остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания остаются и связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота амидной части остова. Способы получения миметиков РНК широко практикуются в данной области техники, и такие способы могут применяться для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, в частности --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[известный как метиленовый (метиляминовый) или ММІ остов], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- и --N(CH₃)--CH₂--[при этом нативный фосфодиэфирный остов представляется в виде --O--P--O--CH₂--]. Способы получения РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеотидов с гетероатомными остовами широко практикуются в данной области техники, и такие способы можно применять для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA, определенных AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или определенных AGT-специфических смысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

Модифицированная РНК также может содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. AGT-специфическая dsRNA, AGT-специфические антисмысловые полинуклеотиды и/или AGT-специфические смысловые полинуклеотиды по настоящему изобретению могут содержать в положении 2' одно из следующего: OH; F; O--, S-- или N-алкил; O--, S-- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенные или незамещенные C₁-C₁₀алкил или C₂-C₁₀алкенил и алкинил. Примеры подходящих модификаций включают: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA в положении 2' содержит одно из следующего: низший C₁-C₁₀алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силлил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу, используемую для улучшения фармакокинетических свойств средства на основе AGT-специфической

dsRNA, или группу, используемую для улучшения фармакодинамических свойств средства на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида и/или AGT-специфического смыслового полинуклеотида, а также другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификации включают 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. алкокси-алкокси группу. Другим примером модификации является 2'-диметиламиноэтоксиэтокси, т.е. группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах, представленных ниже в данном документе, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известный в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH₂-O--CH₂--N(CH₂)₂. Способы получения модифицированных РНК, таких как описанные, широко практикуются в данной области техники, и такие способы можно применять для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации могут быть осуществлены и в других положениях в РНК в составе средства на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, AGT-специфического смыслового полинуклеотида и/или AGT-специфического смыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, в частности в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных AGT-специфической dsRNA, антисмысловых полинуклеотидах AGT или смысловых полинуклеотидах AGT, и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Средства на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфические антисмысловые полинуклеотиды и/или AGT-специфические смысловые полинуклеотиды также могут содержать миметики сахаров, например фрагмент, представляющий собой циклобутил, вместо сахара, представляющего собой пентофуранозил. Способы получения модифицированных РНК, таких, как описанные, широко практикуются в данной области техники, и такие способы можно применять для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA, AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или AGT-специфических смысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфические антисмысловые полинуклеотиды и/или AGT-специфические смысловые полинуклеотиды могут предусматривать модификации или замены нуклеиновых оснований (обычно называемых “основаниями” в данной области техники). При использовании в данном документе “немодифицированные” или “природные” нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и

гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозан, представляющие собой пиримидин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные производные аденина и гуанина, 5-гало, в частности, 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные производные урацила и цитозина; 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-азагуанин и 7-азааденин, а также 3-азагуанин и 3-азааденин. Дополнительные нуклеиновые основания, которые могут быть включены в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в средства на основе AGT-специфической dsRNA, известны из уровня техники, см., например: *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. Ed. Wiley-VCH, 2008; *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, страницы 858-859, Kroschwitz, J. L, Ed. John Wiley & Sons, 1990, English et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, Sanghvi, Y S., глава 15, *dsRNA Research and Applications*, страницы 289-302 и Crooke, ST and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Способы получения dsRNA, полинуклеотидов AGT-специфической антисмысловой нити и/или полинуклеотидов AGT-специфической смысловой нити, предусматривающих модификации и/или замены нуклеиновых оснований, такие как описанные в данном документе, широко практикуются в данной области техники, и такие способы можно применять для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA, полинуклеотидов AGT-специфической смысловой нити и/или AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления средств на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или AGT-специфических смысловых полинуклеотидов предусматривают РНК, модифицированную таким образом, чтобы она содержала одну или несколько замкнутых нуклеиновых кислот (LNA). Замкнутые нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеотиды с модифицированным рибозным фрагментом, который содержит дополнительный мостик, соединяющий атомы 2'- и 4'-углерода. Эта структура эффективно “замыкает” рибозу в 3'-эндоструктурной конформации. Добавление замкнутой нуклеиновой кислоты к средству на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфическому антисмысловому полинуклеотиду и/или AGT-специфическому смысловому полинуклеотиду по настоящему изобретению может обеспечить повышение стабильности в сыворотке крови и снижение нецелевых эффектов (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, O R. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Способы получения средств на основе dsRNA, AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или AGT-специфических смысловых полинуклеотидов, которые содержат замкнутые нуклеиновые кислоты, широко практикуются в данной области техники, и такие способы можно применять для получения определенных средств на основе модифицированной AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению. В

некоторых вариантах осуществления соединения на основе AGT-специфической dsRNA, смысловые полинуклеотиды и/или антисмысловые полинуклеотиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает: 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2',3'-секонуклеотидные мимики, замкнутые нуклеотиды, 2'-F-арабинонуклеотиды, 2'-метоксиэтилнуклеотиды, 2'-аминомодифицированные нуклеотиды, 2'-алкиломодифицированные нуклеотиды, морфолинонуклеотиды и 3'-ОМе-нуклеотиды, нуклеотиды, содержащие 5'-фосфоротиоатную группу, или концевые нуклеотиды, соединенные с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-аминомодифицированные нуклеотиды, фосфорамидаты, или нуклеотиды, содержащие не встречающиеся в природе основания. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе AGT-специфической dsRNA содержит нуклеотид, представляющий собой Е-винилфосфонат, на 5'-конце антисмысловой нити (также называемой в данном документе направляющей нитью).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включен в соединение на основе AGT-специфической dsRNA, 3'- и 5'-концы смыслового полинуклеотида и/или 3'-конец антисмыслового полинуклеотида, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями, рибитол, инвертированные нуклеотиды, инвертированные нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями, инвертированные 2'-ОМе-нуклеотиды и инвертированные 2'-дезоксинуклеотиды. Специалистам в данной области техники известно, что включение нуклеотидов с удаленными азотистыми основаниями или инвертированных нуклеотидов с удаленными азотистыми основаниями в конце олигонуклеотида может обеспечить повышение его стабильности (Czauderna et al. Structural variations and stabilizing modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2705-2716. doi:10.1093/nar/gkg393).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединения на основе AGT-специфической dsRNA и антисмысловые полинуклеотиды содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, где указанный по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает нуклеотиды типа "незамкнутой нуклеиновой кислоты" (UNA) и/или нуклеотиды типа "гликолевой нуклеиновой кислоты" (GNA). Специалистам в данной области техники известно, что UNA и GNA являются термически нестабильными химическими модификациями, которые могут обеспечить значительное улучшение в отношении профиля нецелевого связывания соединения на основе siRNA (Janas, et al., Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. *Nat Commun* 2018;9(1):723. doi:10.1038/s41467-018-02989-4; Laursen et al., Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo. *Mol BioSyst.* 2010; 6:862-70).

Другая модификация, которая может быть включена в РНК в некоторых вариантах осуществления средств на основе АГТ-специфической dsRNA, АГТ-специфических антисмысловых полинуклеотидов и/или АГТ-специфических смысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению, предусматривает один или несколько лигандов, фрагментов или конъюгатов, химически соединенных с РНК, которые усиливают одну или несколько характеристик средства на основе АГТ-специфической dsRNA, АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида и/или АГТ-специфического смыслового полинуклеотида соответственно. Неограничивающими примерами характеристик, которые могут быть улучшены, являются: активность средства на основе АГТ-специфической dsRNA, АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида и/или АГТ-специфического смыслового полинуклеотида, распределение в клетках, доставка средства на основе АГТ-специфической dsRNA, фармакокинетические свойства средства на основе АГТ-специфической dsRNA и поглощение средства на основе АГТ-специфической dsRNA клетками. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе АГТ-специфической dsRNA содержат одну или несколько нацеливающих или связывающих групп, которые в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгированы со смысловой нитью. Неограничивающим примером нацеливающих групп являются соединения, содержащие N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Термины “нацеливающее средство”, “связывающее средство”, “нацеливающее соединение” и “нацеливающий лиганд” могут применяться в данном документе взаимозаменяемо. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе АГТ-специфической dsRNA содержат нацеливающее соединение, конъюгированное с 5'-концом смысловой нити. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе АГТ-специфической dsRNA содержат нацеливающее соединение, конъюгированное с 3'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе АГТ-специфической dsRNA содержит нацеливающую группу, содержащую GalNAc. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе АГТ-специфической dsRNA не содержит нацеливающее соединение, конъюгированное с одним или обоими из 3'-конца и 5'-конца смысловой нити. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе АГТ-специфической dsRNA не содержит нацеливающее соединение, содержащее GalNAc, конъюгированное с одним или обоими из 5'-конца и 3'-конца смысловой нити.

Дополнительные нацеливающие и связывающие средства хорошо известны в данной области техники, например нацеливающие и связывающие средства, применимые в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестеринные фрагменты (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4:1053-1060), тиоэфиры, такие как берил-S-тримитилтиол (Manoharan et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1993,

3:2765-2770), тиохолестерины (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатические цепи, такие как додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипиды, такие как 2-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний-1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицерин-3-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), полиаминовые или полиэтиленгликолевые цепи (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973) или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитоиловые фрагменты (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) или октадециламиновые или гексиламинокарбонилхолестериновые фрагменты (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Некоторые варианты осуществления композиций, содержащих средства на основе AGT-специфической dsRNA, AGT-специфические антисмысловые полинуклеотиды и/или AGT-специфические смысловые полинуклеотиды, могут предусматривать лиганды, которые обеспечивают изменение свойств распределения, нацеливания и т. п. средства на основе AGT-специфической dsRNA. В некоторых вариантах осуществления композиций, содержащих средство на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению, например, лиганд обеспечивает увеличение аффинности к выбранной мишени (например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например компартменту клетки или органа, ткани, органу или участку тела) по сравнению с молекулой, в которой такой лиганд не присутствует). Лиганды, применимые в композициях и/или способах по настоящему изобретению, могут представлять собой встречающиеся в природе вещества, такие как белки (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин), углеводы (например, декстран, амилопектин, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липиды. Лиганды также могут представлять собой рекомбинантные или синтетические молекулы, например синтетические полимеры, такие как синтетические полиаминокислоты или полиамины. Примерами полиаминокислот являются полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновая кислота, поли-L-глутаминовая кислота, сополимер стирола с малеиновым ангидридом, сополимер поли(L-лактидгликолевая кислота), сополимер дивинилового эфира с малеиновым ангидридом, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламид (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), N-изопропилакриламидный полимер или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамины, псевдопептид-полиамины, полиамины на основе пептидомиметиков, дендритные полиамины, аргинин, амидин, протамин, катионные липиды, катионные порфирины, четвертичные соли полиаминов или α -спиральные пептиды.

Лиганды, включенные в композиции и/или способы по настоящему изобретению, могут предусматривать нацеливающие группы, неограничивающимися примерами которых являются средства, нацеливающие на клетки или ткани, например лектины, гликопротеины,

липиды или белки, например антитело, связывающееся со конкретными типами клеток, такими как клетки почек или клетки печени. Нацеливающие группы могут представлять собой тиреотропин, меланоген, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липиды, холестерин, стероиды, желчные кислоты, фолиевую кислоту, витамин B12, витамин А, биотин или RGD-пептиды или миметики RGD-пептидов.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркаляторы (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например холестерин, холевая кислота, адамантануксусная кислота, 1-пиренмасляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексил, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецил, пальмитиновая кислота, миристиновая кислота, О3-(олеоил)лихолевая кислота, О3-(олеоил)холевая кислота, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид из antennapedia, пептид из Tat), алкилирующие средства, фосфаты, аминокислоты, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, маркеры, меченные радиоактивными веществами, ферменты, гаптены (например, биотин), энхансеры транспорта/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu³⁺ с тетраазамакроциклами), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды, включенные в композиции и/или способы по настоящему изобретению, могут представлять собой белки, например гликопротеины или пептиды, например молекулу со специфической аффинностью к солиганду, или антитела, например антитело, связывающееся с конкретными типами клеток, такими как раковые клетки, эндотелиальные клетки, кардиомиоциты или клетки костной ткани. Лиганды, применимые в вариантах осуществления композиций и/или способов по настоящему изобретению, могут представлять собой гормоны или рецепторы гормонов. Лиганды, применимые в вариантах осуществления композиций и/или способов по настоящему изобретению, могут представлять собой липиды, лектины, углеводы, витамины, коферменты, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганды, применимые в вариантах осуществления композиций и/или способов по настоящему изобретению, могут представлять собой вещества, которые увеличивают степень распространения средства на основе AGT-специфической dsRNA в клетке, например, путем разрушения цитоскелета клетки (например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или

промежуточных филаментов клетки). Неограничивающими примерами таких средств являются: таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джасплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин и миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганды, присоединяемые к средствам на основе АГТ-специфической dsRNA, служат в качестве модуляторов фармакокинетики (РК). Примеры модуляторов РК, применимых в композициях и способах по настоящему изобретению, включают без ограничения следующие: липофильные средства, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белковые связывающие средства, PEG, витамины, холестерин, жирные кислоты, холевая кислота, литохолевая кислота, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и аптамеры, связывающиеся с белками сыворотки крови, и т. д. Известно, что олигонуклеотиды, содержащие множество фосфоротиоатных связей, также связываются с белками сыворотки крови, поэтому короткие олигонуклеотиды, содержащие множество фосфоротиоатных связей в остове, например олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, могут также являться лигандами в композициях и/или способах по настоящему изобретению.

Композиции, содержащие средство на основе АГТ-специфической dsRNA

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе АГТ-специфической dsRNA находится в композиции. Композиции по настоящему изобретению могут содержать одно или несколько средств на основе АГТ-специфической dsRNA и, необязательно, один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, средств для доставки, нацеливающих средств, поддающихся выявлению меток и т. д. Неограничивающими примерами нацеливающих средств, которые могут являться применимыми в некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению, являются средства, которые обеспечивают направление средства на основе АГТ-специфической dsRNA по настоящему изобретению к клетке, подлежащей лечению, или в нее. Выбор нацеливающего средства будет зависеть от природы заболевания или состояния, ассоциированных с АГТ, а также от типа клетки-мишени. В неограничивающем примере в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может быть необходимым нацеливание средства на основе АГТ-специфической dsRNA на гепатоциты и/или внутрь них. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению терапевтическое средство предусматривает средство на основе АГТ-специфической dsRNA, объединенное только со средством для доставки, например средством для доставки, содержащим N-ацетилгалактозамин (GalNAc), без каких-либо дополнительных связующих элементов. Например, в некоторых аспектах настоящего изобретения средство на основе АГТ-специфической dsRNA может быть соединено с соединением для доставки, содержащим GalNAc, и включено в композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, и введено в клетку или субъекту в отсутствие какой-либо поддающейся выявлению метки, нацеливающих средств и т. д., соединенных со средством на основе АГТ-специфической dsRNA.

Если средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению вводят вместе и/или связанными с одним или несколькими средствами для доставки, нацеливающими средствами, метящими средствами и т. д., специалист в данной области техники будет обладать необходимыми знаниями и сможет выбрать и использовать соответствующие средства для применения в способах по настоящему изобретению. Метящие средства могут применяться в определенных способах по настоящему изобретению для определения местоположения средства на основе AGT-специфической dsRNA в клетках и тканях и могут применяться для идентификации местоположения в клетке, ткани или органе терапевтической композиции, содержащей средство на основе AGT-специфической dsRNA, вводимой в способах по настоящему изобретению. Средства для присоединения и применения метящих реагентов, таких как ферментные метки, красители, радиоактивные метки и т. д., хорошо известны в данной области техники. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению метящее средство связано с одним или обоими из смыслового и антисмыслового полинуклеотидов, включенных в средство на основе AGT-специфической dsRNA.

Доставка средств на основе AGT-специфической dsRNA и средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида

Некоторые варианты осуществления способов по настоящему изобретению предусматривают доставку средства на основе AGT-специфической dsRNA в клетку. При использовании в данном документе термин “доставка” означает содействие поглощению или усвоению клетками или влияние на них. Абсорбция или поглощение средств на основе AGT-специфической dsRNA может происходить независимо путем диффузии, или посредством активных клеточных процессов, или путем применения средств для доставки, нацеливающих средств и т. д., которые могут быть ассоциированы со средством на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению. Режимы доставки, подходящие для применения в способах по настоящему изобретению, включают без ограничения доставку *in vivo*, при которой средство на основе AGT-специфической dsRNA вводят путем инъекции в участок ткани или вводят системно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA соединено со средством для доставки.

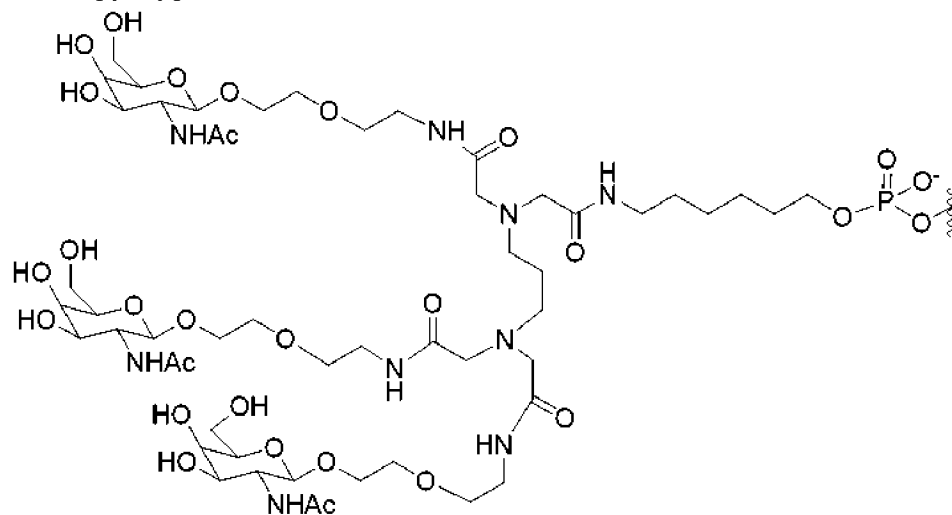
Неограничивающие примеры способов, которые можно применить для доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA к клеткам, тканям и/или субъектам, включают: конъюгаты AGT-специфической dsRNA с GalNAc, технология SAMiRNA, способы доставки на основе LNP и доставка "голой" РНК. Эти и другие способы доставки были успешно применены в данной области техники для доставки терапевтических средств для RNAi для лечения различных заболеваний и состояний, таких как без ограничения: заболевания печени, острая перемежающаяся порфирия (AIP), гемофилия, фиброз легких и т. д. Подробности о различных способах доставки можно найти в публикациях, таких как следующие: Nikam, R. R. & K. R. Gore (2018) *Nucleic Acid Ther*, 28 (4), 209-224, август 2018

г.; Springer A. D. & S. F. Dowdy (2018) *Nucleic Acid Ther.*, 1 июня; 28(3): 109-118; Lee, K. et al., (2018) *Arch Pharm Res*, 41(9), 867-874; и Nair, J. K. et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136:16958-16961, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

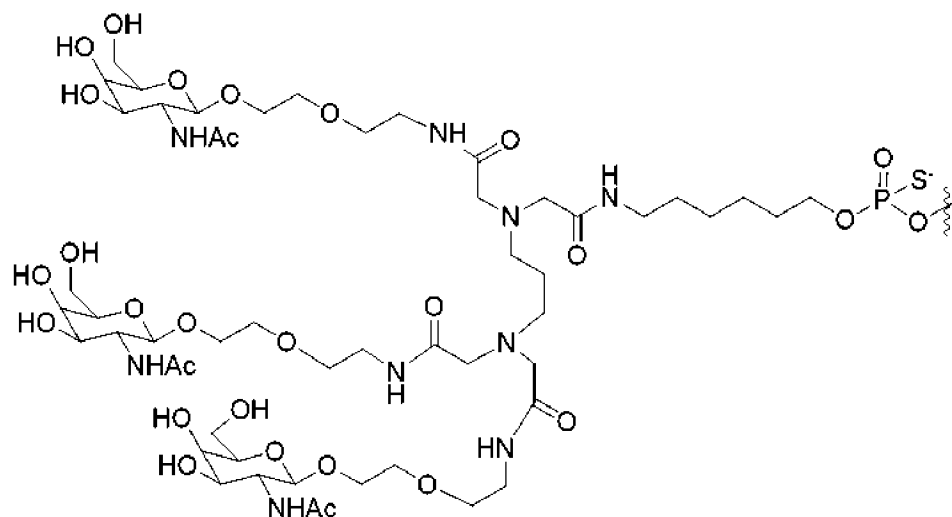
Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение липидных наночастиц (LNP) для доставки средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению в клетку, ткань и/или организм субъекта. LNP широко применяются для доставки *in vivo* средств на основе AGT-специфической dsRNA, в том числе терапевтических средств на основе AGT-специфической dsRNA. Одно из преимуществ применения LNP или другого средства для доставки заключается в том, что стабильность средства на основе AGT-специфической РНК повышается при доставке субъекту с помощью LNP или другого средства для доставки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP предусматривает катионную LNP, нагруженную одной или несколькими молекулами для AGT-специфической RNAi по настоящему изобретению. LNP, содержащую молекулу(молекулы) для AGT-специфической RNAi, вводят субъекту, LNP и присоединенные к ней молекулы для AGT-специфической RNAi поглощаются клетками посредством эндоцитоза, и их присутствие приводит к высвобождению молекул, запускающих RNAi, тем самым опосредуя RNAi.

Другой неограничивающий пример средства для доставки, которое можно применять в вариантах осуществления настоящего изобретения для доставки средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению к клетке, ткани и/или организму субъекта, представляет собой средство, содержащее GalNAc, которое связано со средством на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению и доставляет средство на основе AGT-специфической dsRNA к клетке, ткани и/или организму субъекта. Примеры некоторых других содержащих GalNAc средств для доставки, которые могут использоваться в определенных вариантах осуществления способов и композиций по настоящему изобретению, раскрыты в заявке РСТ WO2020191183A1. Неограничивающим примером нацеливающего лиганда на основе GalNAc, который можно применять в композициях и способах по настоящему изобретению для доставки средства на основе AGT-специфической dsRNA в клетку, является кластер нацеливающих лигандов. Примерами кластеров нацеливающих лигандов, предложенных в данном документе, являются: лиганды на основе GalNAc с фосфодиэфирными связями (GLO) и лиганды на основе GalNAc с фосфоротиоатными связями (GLS). Термин "GLX-n" может использоваться в данном документе для обозначения того, что присоединенное соединение, содержащее GalNAc, представляет собой любое из соединений GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16,, структура каждого из которых показана ниже. На приведенных ниже фигурах положение соединения нацеливающего лиганда на основе GalNAc и средства для RNAi по настоящему изобретению находится на

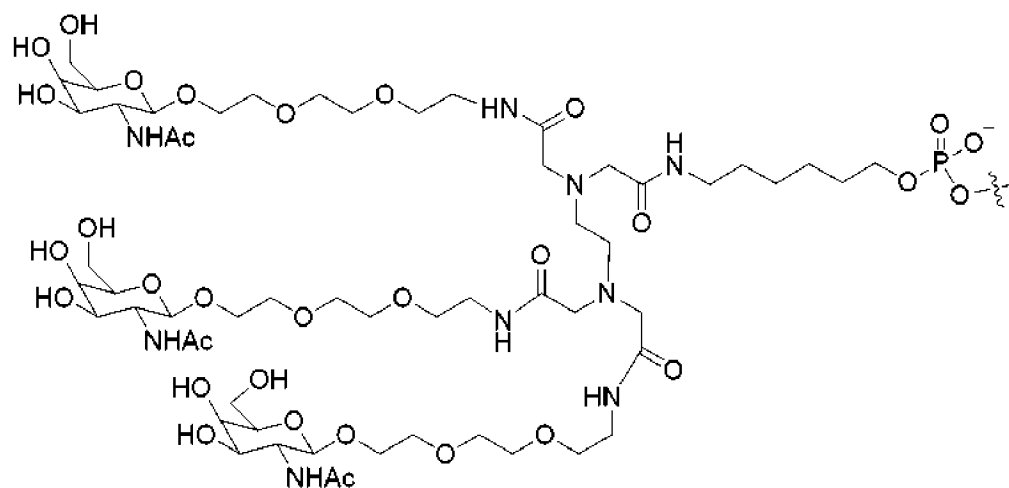
крайней правой стороне каждого нацеливающего лиганда. Следует понимать, что любая молекула для RNAi и на основе dsRNA по настоящему изобретению может быть соединена с GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16. Ниже приведены структуры GLO-1 - GLO-16 и GLS-1 - GLS-16.



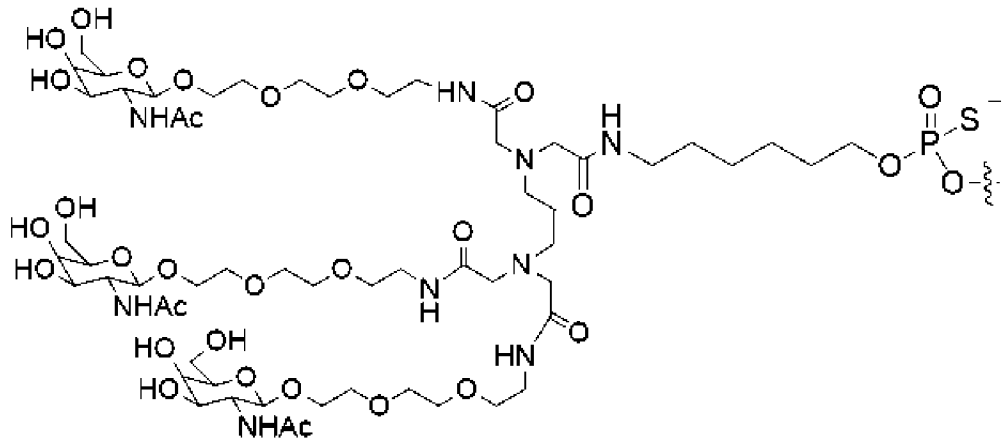
GLO-1



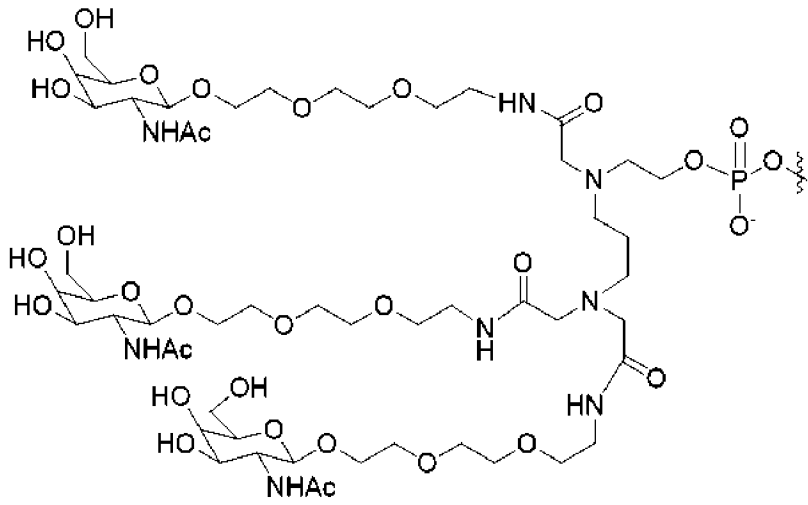
GLS-1



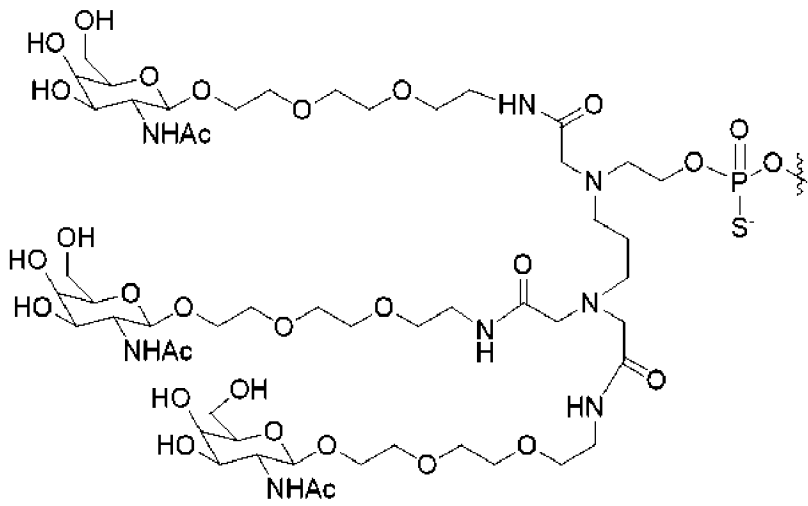
GLO-2



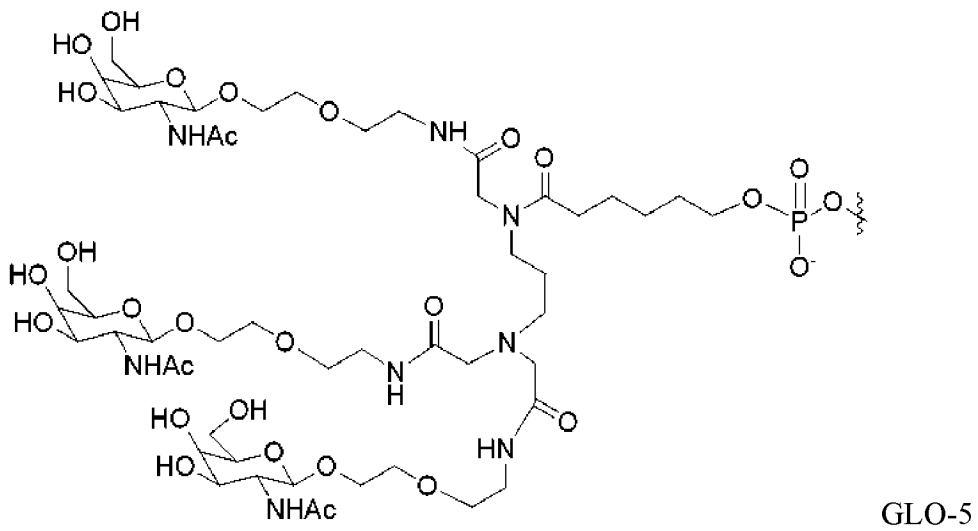
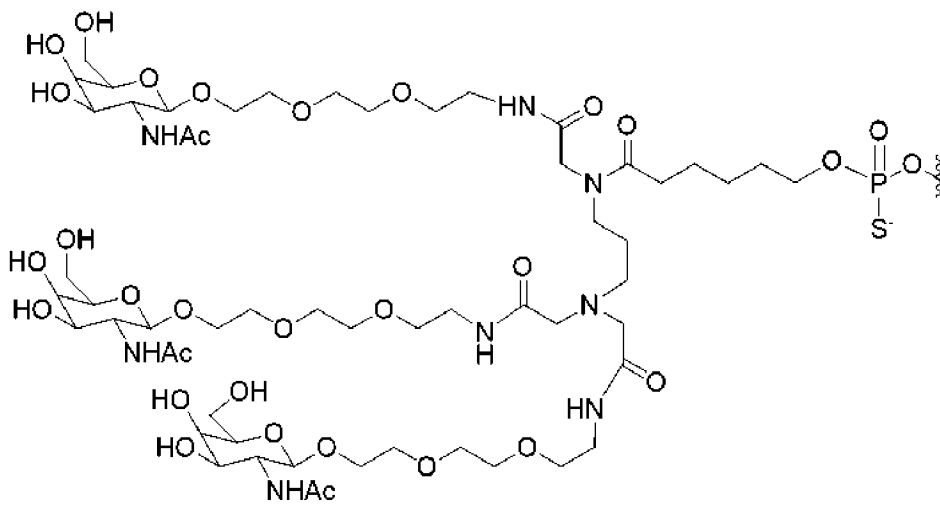
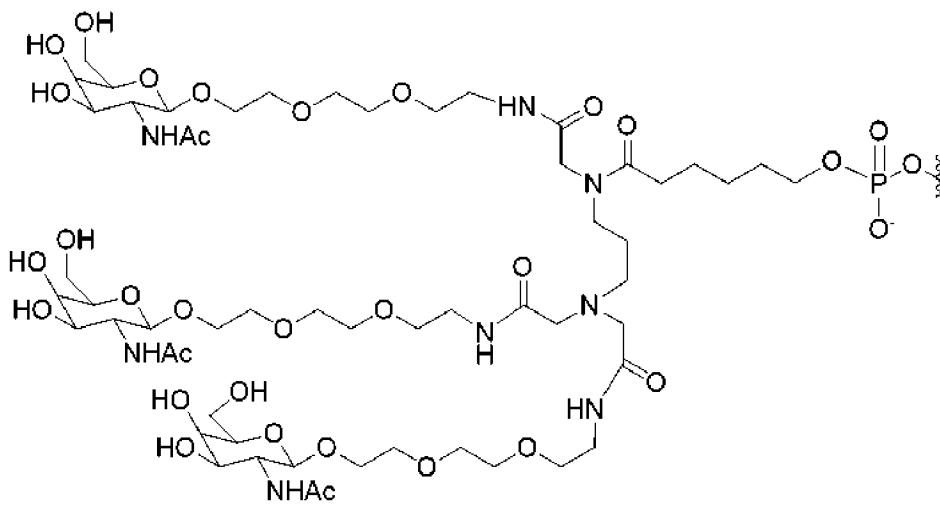
GLS-2

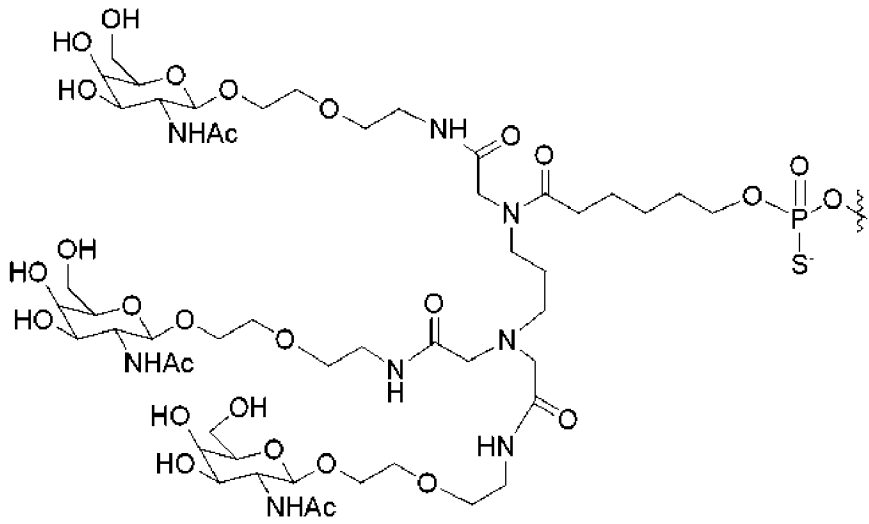


GLO-3

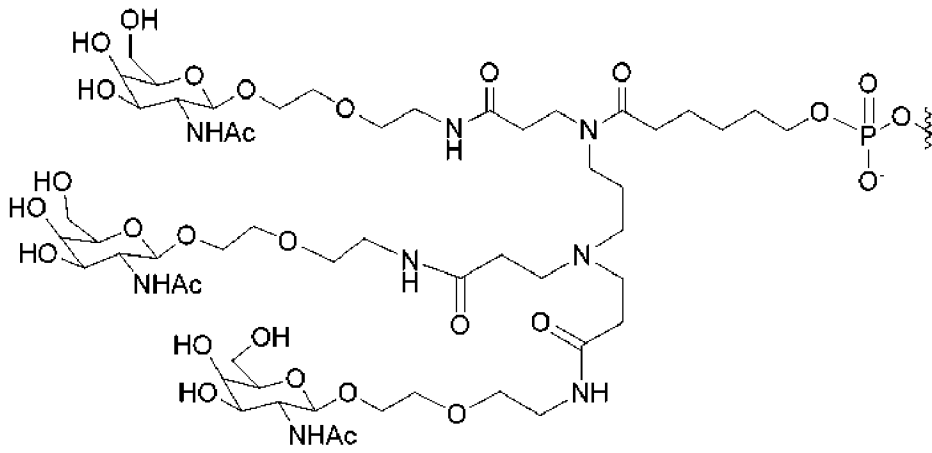


GLS-3

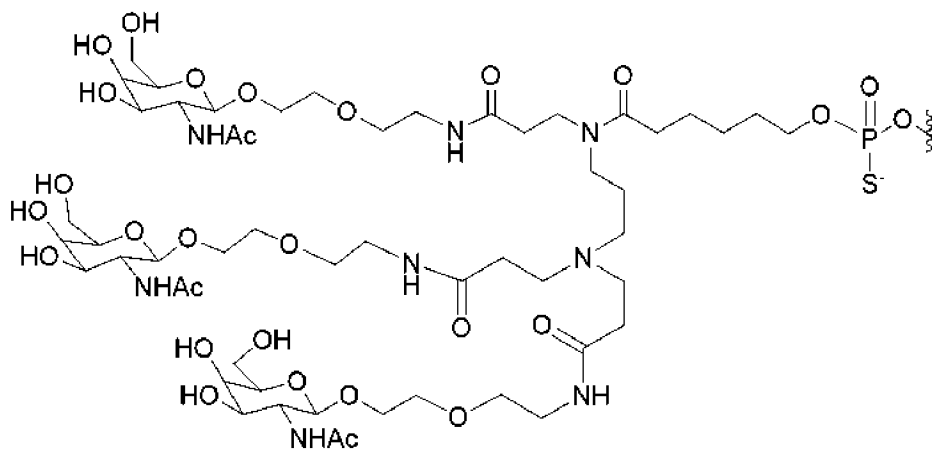




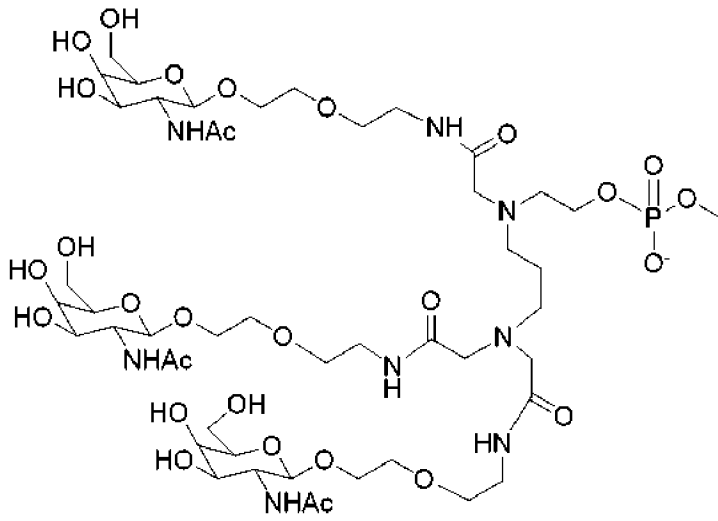
GLS-5



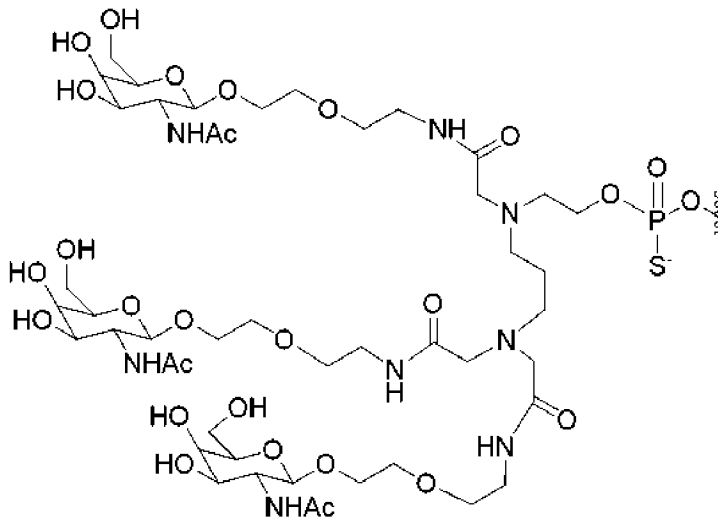
GLO-6



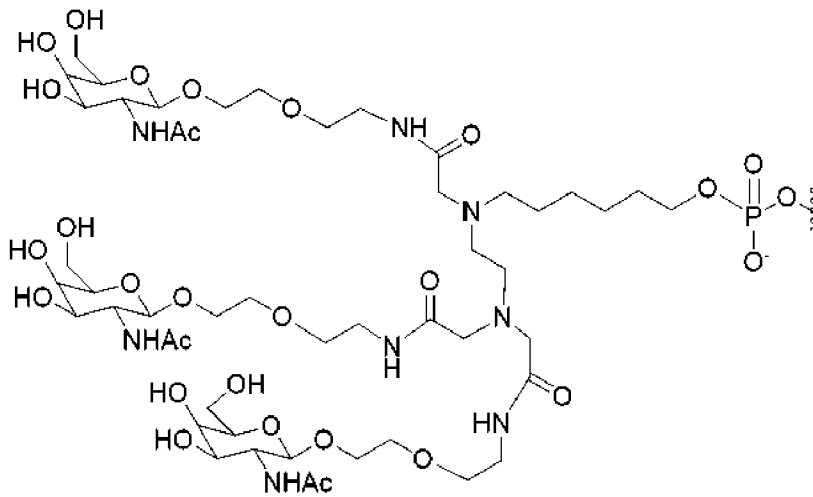
GLS-6



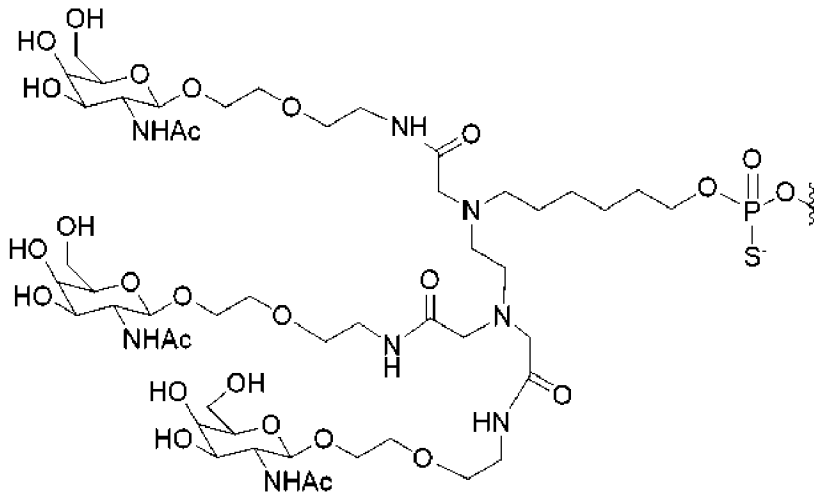
GLO-7



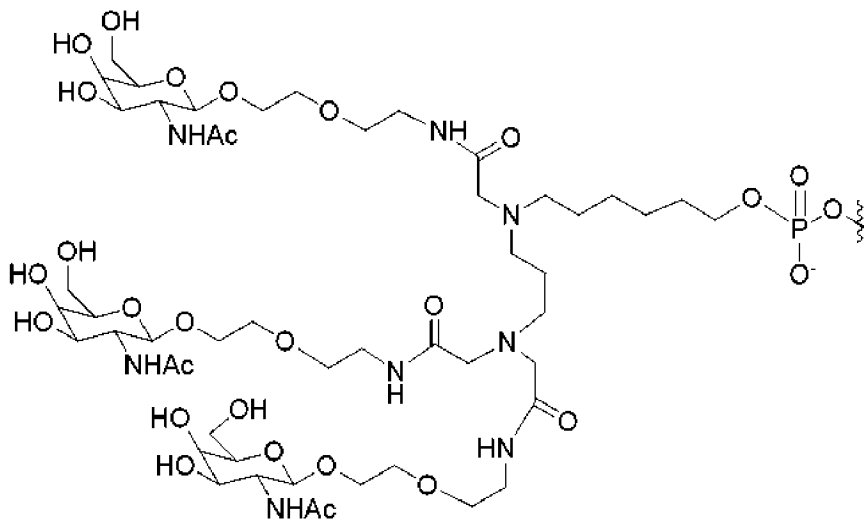
GLS-7



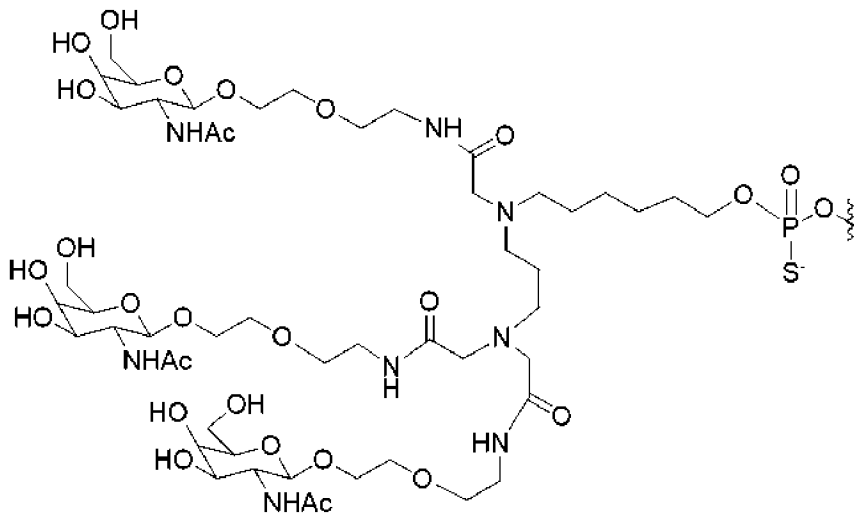
GLO-8



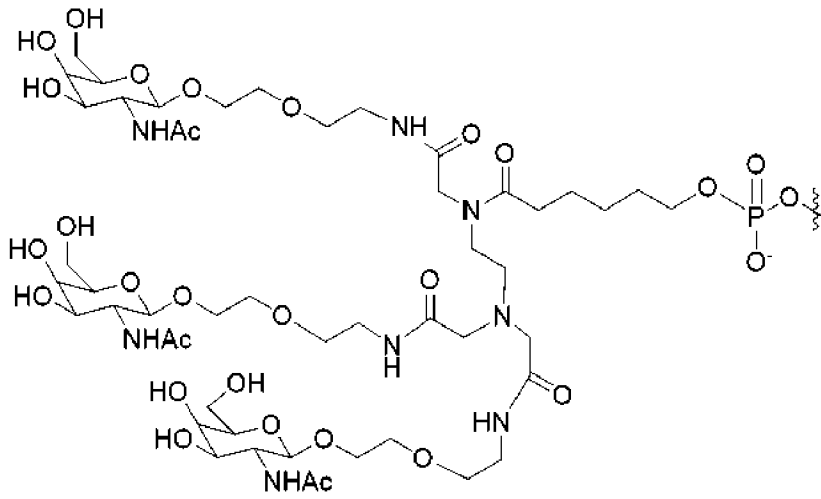
GLS-8



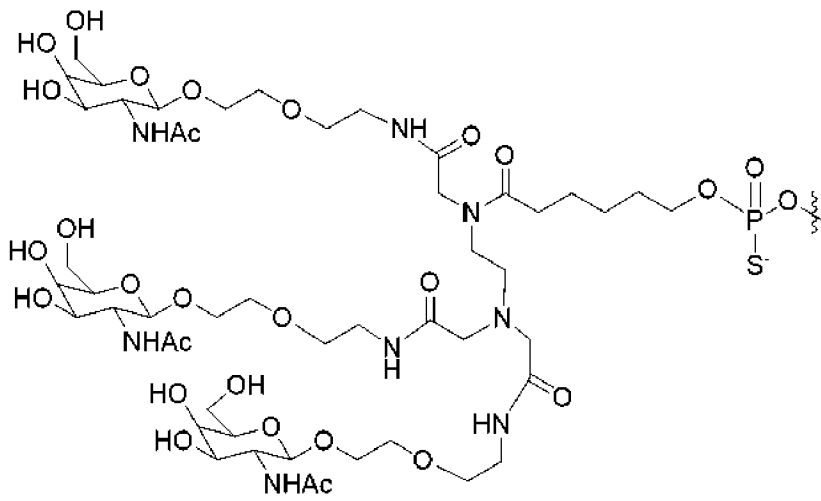
GLO-9



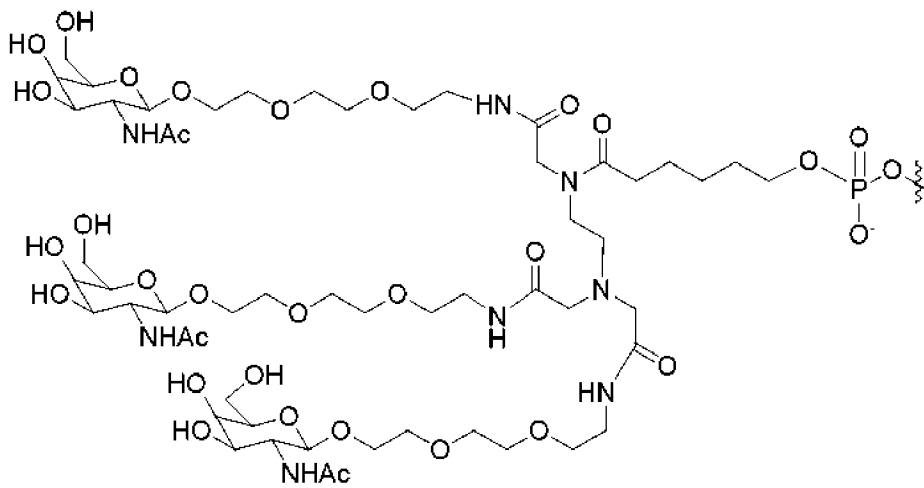
GLS-9



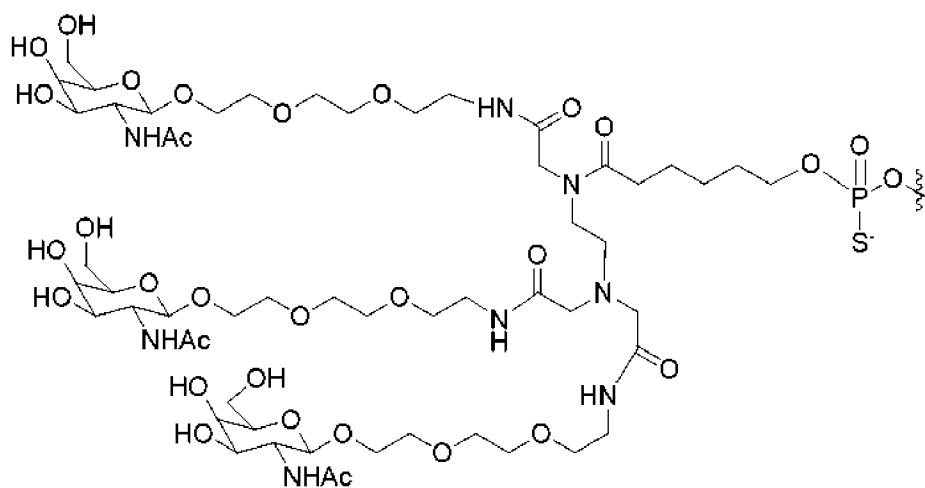
GLO-10



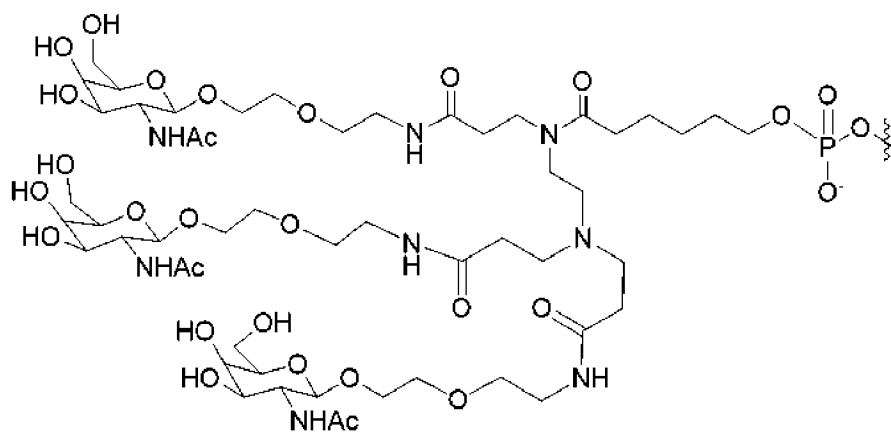
GLS-10



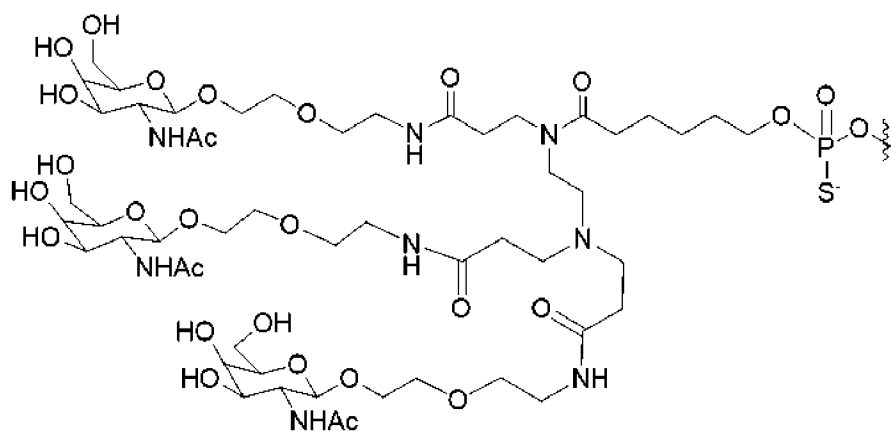
GLO-11



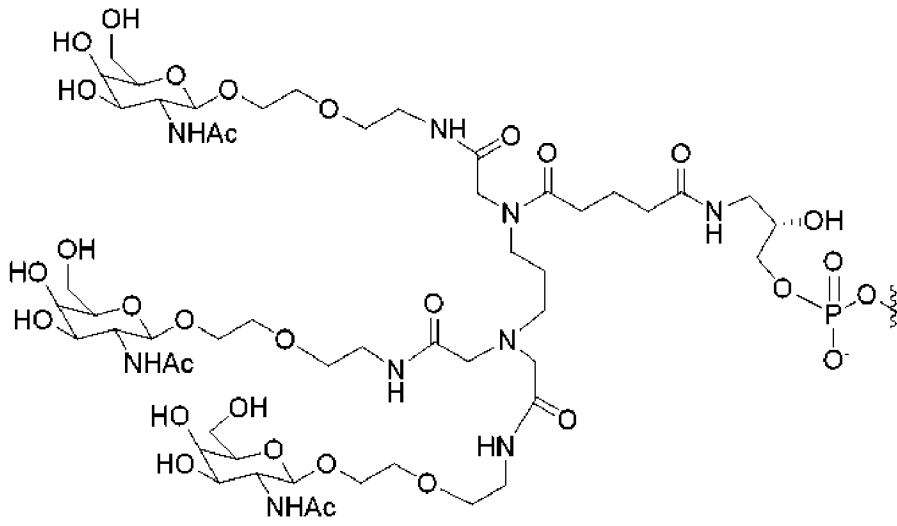
GLS-11



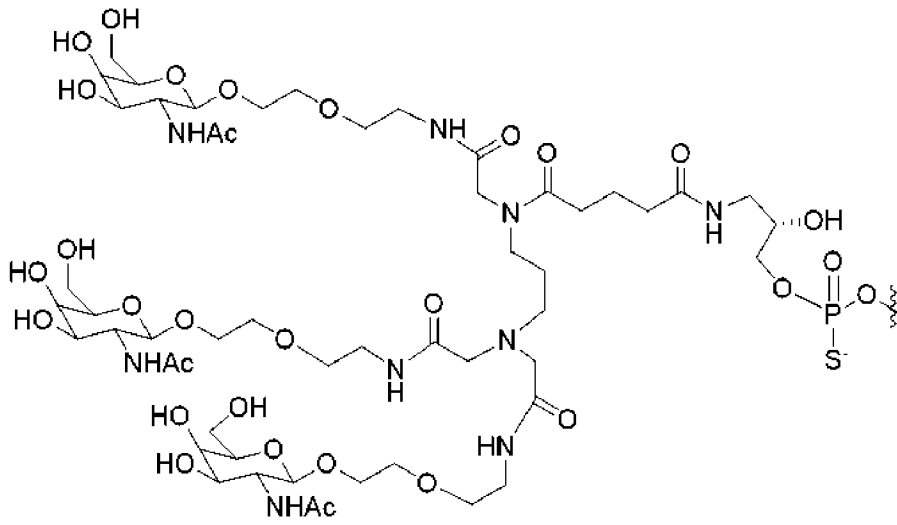
GLO-12



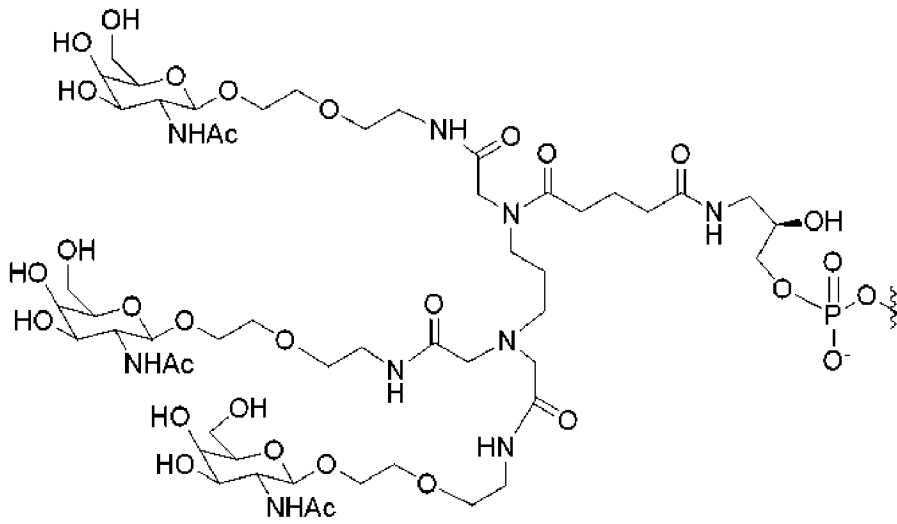
GLS-12



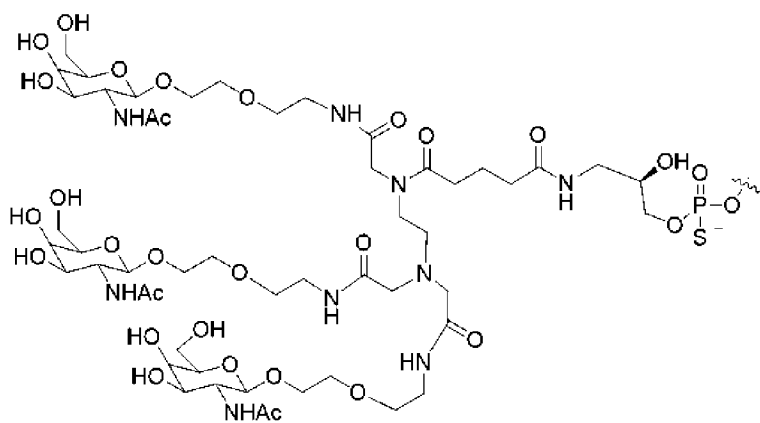
GLO-13



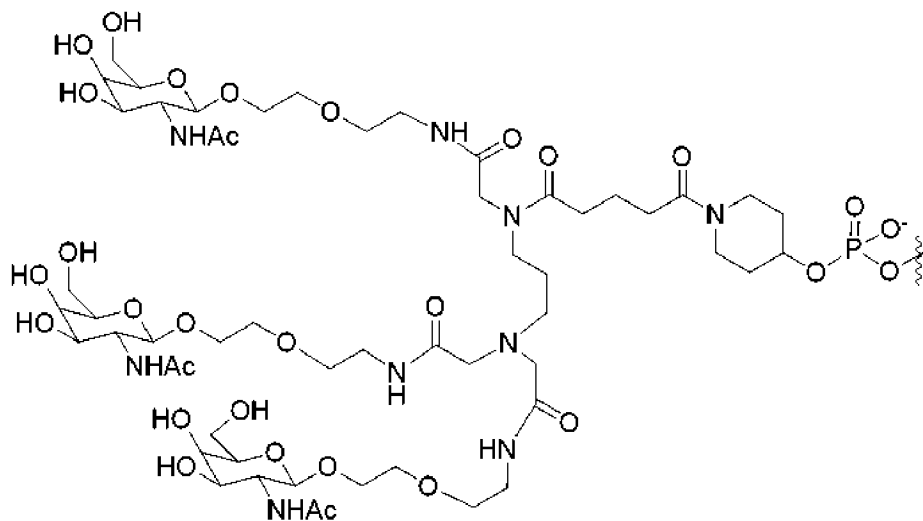
GLS-13



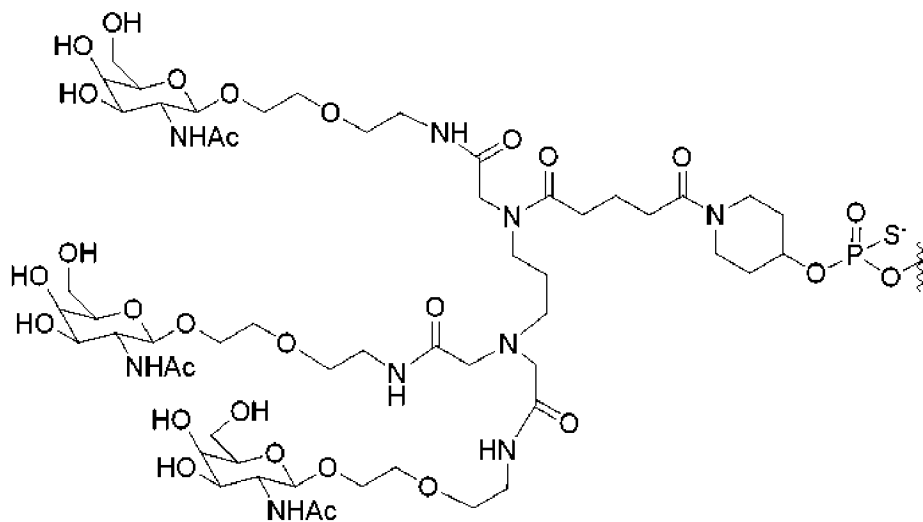
GLO-14



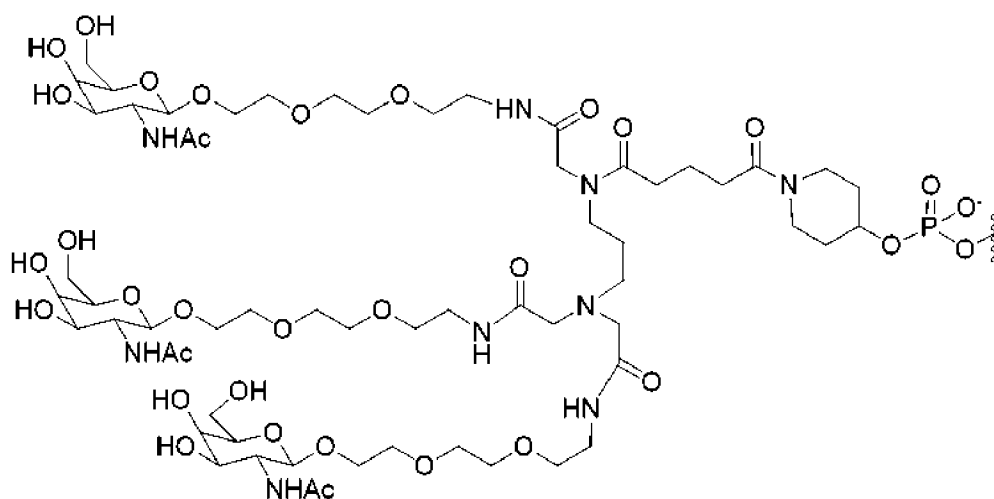
GLS-14



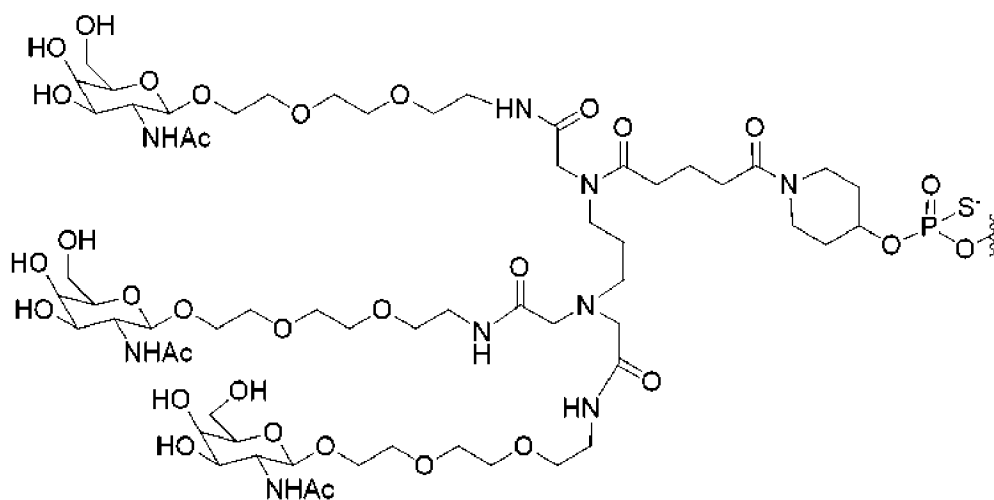
GLO-15



GLS-15



GLO-16



GLS-16.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставка *in vivo* может также представлять собой систему доставки на основе бета-глюкана, например, описанную в патентах США №№ 5032401 и 5607677, а также в публикации заявки на патент США № 2005/0281781, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Средства для AGT-специфической RNAi также могут быть введены в клетки *in vitro* с применением известных в данной области техники способов, таких как электропорация и липофекция. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения доставку AGT-специфической dsRNA осуществляют без нацеливающего средства. Эти РНК могут быть доставлены в виде “голых” молекул РНК. В качестве неограничивающего примера AGT-специфическая dsRNA по настоящему изобретению может быть введена субъекту в фармацевтической композиции, содержащей средство для RNAi, но не содержащей нацеливающее средство (например, нацеливающее средство на основе GalNAc), для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT субъекта, например гипертензии.

Следует понимать, что в дополнение к определенным способам доставки, описанным в данном документе, другие способы доставки средства для RNAi могут применяться в сочетании с вариантами осуществления средств для AGT-специфической RNAi и терапевтических способов, описанных в данном документе, таких как без

ограничения описанные в данном документе и используемые в данной области техники.

Средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению можно вводить субъекту в количестве и способом, которые являются эффективными для снижения уровня и активности полипептида AGT в клетке и/или организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению одно или несколько средств на основе AGT-специфической dsRNA вводят в клетки и/или организм субъекта для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с экспрессией и активностью AGT. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению предусматривают введение одного или нескольких средств на основе AGT-специфической dsRNA субъекту, нуждающемуся в таком лечении, с целью облегчения течения заболевания или состояния, ассоциированных с экспрессией AGT у субъекта. Средство на основе AGT-специфической dsRNA или AGT-специфический антисмысловый полинуклеотид по настоящему изобретению можно вводить для снижения экспрессии и/или активности AGT в одном или нескольких из вариантов, представляющих собой клетки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения уровень полипептида AGT в клетке, а значит и его активность, снижают путем доставки (например, введения) в клетку средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида. Нацеливающие средства и способы нацеливания можно применять для обеспечения доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в определенный тип клеток, подтип клеток, орган или пространственный участок внутри организма субъекта и/или субклеточный участок внутри клетки. В некоторых способах по настоящему изобретению средства на основе AGT-специфической dsRNA можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами на основе AGT-специфической dsRNA. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят 2, 3, 4 или больше независимо выбранных средств на основе AGT-специфической dsRNA. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA вводят субъекту для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапевтическими схемами для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. Неограничивающими примерами дополнительных схем лечения являются введение одного или нескольких AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению, введение терапевтических средств, отличных от AGT-специфической dsRNA, и модификация образа жизни. Дополнительную терапевтическую схему можно вводить в один или более из следующих моментов времени: до введения средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению, одновременно с ним и после него. Следует понимать, что “одновременно” при использовании в данном документе означает в течение 5 минут от нулевого момента времени, в течение 10 минут от нулевого момента времени, в течение 30

минут от нулевого момента времени, в течение 45 минут от нулевого момента времени и в течение 60 минут от нулевого момента времени, где "нулевой момент времени" представляет собой момент времени, в который средство на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению вводят субъекту. Неограничивающими примерами терапевтических средств, отличных от AGT-специфической dsRNA, являются: дополнительные терапевтические средства, такие как диуретики, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), антагонисты рецепторов ангиотензина II, бета-блокаторы, вазодилататоры, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты альдостерона, альфа-2-агонисты, ингибиторы ренина, альфа-блокаторы, периферически действующие адренергические средства, селективные частичные агонисты рецептора D1, неселективные альфа-адренергические антагонисты, синтетические стероидные антиминералокортикоиды или комбинации любых из вышеперечисленных средств, а также терапевтические средства от гипертензии, составленные в фармацевтические комбинации. Неограничивающими примерами модификации образа жизни являются: режим питания, психологическая помощь и физические упражнения. Эти и другие терапевтические средства и модификации образа жизни известны в данной области техники и их можно применять для лечения связанных с AGT заболеваний или состояний у субъекта, а также их можно вводить субъекту в комбинации с одним или несколькими средствами на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению для лечения связанных с AGT заболевания или состояния. Средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению, которые вводят в клетку или организм субъекта для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, могут действовать синергическим образом с одним или несколькими другими терапевтическими средствами или активными ингредиентами с обеспечением таким образом усиления эффективности одного или нескольких терапевтических средств или активных ингредиентов и/или повышения эффективности средства на основе AGT-специфической dsRNA в лечении заболевания или состояния, ассоциированных с AGT.

Способ лечения по настоящему изобретению включает введение средства на основе AGT-специфической dsRNA, которое можно применять до начала заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, включая раннюю, среднюю, позднюю стадии заболевания или состояния, и/или при наличии таковых, а также в любое время до или после любой из этих стадий. Посредством способов по настоящему изобретению также можно обеспечивать лечение субъектов, которые ранее получали лечение заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, с помощью одного или нескольких других терапевтических средств и/или терапевтических активных ингредиентов, где одно или несколько других терапевтических средств и/или активных ингредиентов оказались неэффективными, минимально эффективными и/или перестали быть эффективными при лечении заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта.

Кодируемая вектором dsRNA

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения для доставки

средства на основе AGT-специфической dsRNA в клетки может применяться вектор. Транскрипционные единицы средства на основе AGT-специфической dsRNA могут быть включены в ДНК- или РНК-векторы. Получение и применение таких кодирующих трансгенов векторов для доставки последовательностей в клетку и/или организм субъекта хорошо известны в данной области техники. Для способов по настоящему изобретению можно применять векторы, обеспечивающие временную экспрессию AGT-специфической dsRNA, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше часов или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше недель. Продолжительность временной экспрессии может быть определена с помощью обычных способов, исходя из таких факторов, как без ограничения выбранная конкретная векторная конструкция и клетка- и/или ткань-мишень. Такие трансгены могут быть введены в виде линейных конструкций, кольцевых плазмид или вирусных векторов, которые могут представлять собой интегрирующие или неинтегрирующие векторы. Трансгены также могут быть сконструированы таким образом, чтобы они наследовались в виде внехромосомных плазмид (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

С промотора в векторе экспрессии может транскрибироваться одна или несколько одиночных нитей средства на основе AGT-специфической dsRNA. Если необходимо обеспечить экспрессию двух отдельных нитей для создания, например, dsRNA, два отдельных вектора экспрессии могут быть совместно введены в клетку с применением таких средств, как трансфекция или инфекция. В определенных вариантах осуществления каждая отдельная нить средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению может транскрибироваться с промоторов, включенных в один и тот же вектор экспрессии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью таким образом, что средство на основе AGT-специфической dsRNA имеет структуру стебля и петли.

Неограничивающими примерами векторов для экспрессии РНК являются ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Векторы экспрессии, применимые в вариантах осуществления настоящего изобретения, могут быть совместимыми с эукариотическими клетками. Эукариотические векторы экспрессии широко применяются в данной области техники и доступны из многих коммерческих источников. Доставка вектора экспрессии AGT-специфической dsRNA может быть системной, как, например, осуществляемая путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, извлекаемые из организма субъекта и затем вновь вводимые в организм субъекта, или с помощью любых других средств, обеспечивающих введение в необходимые клетки-мишени.

Вирусные векторные системы, которые могут быть предусмотрены вариантом осуществления способа, включают без ограничения следующие: (а) аденовирусные векторы; (б) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы,

вирус лейкоза мышей Молони и т. п.; (с) векторы на основе аденоассоциированных вирусов; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (е) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) поксвирусные векторы, такие как ортопоксвирусные векторы, например векторы на основе вируса осповакцины или векторы на основе поксвируса птиц, такие как векторы на основе поксвируса канарейки или курицы; (j) хелпер-зависимые векторы или векторы на основе "выпотрошенного" аденовируса. Конструкции для рекомбинантной экспрессии средств на основе AGT-специфической dsRNA могут содержать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры и т. д., которые могут быть выбраны для обеспечения конститутивной или регулируемой/индуцируемой экспрессии. Вирусные векторные системы и применение промоторов и энхансеров и т. д. являются широко распространенными в данной области техники и могут использоваться в сочетании с описанными в данном документе способами и композициями.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение вирусных векторов для доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA в клетки. Ряд систем доставки на основе аденовирусов широко применяется в данной области техники для доставки, например, в легкие, печень, центральную нервную систему, эндотелиальные клетки и мышечную ткань. Неограничивающими примерами вирусных векторов, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, являются: векторы на основе AAV, поксвирусы, такие как вирус осповакцины, модифицированный вирус Анкара (MVA), NYVAC, или поксвирусы птиц, например поксвирусы канарейки и курицы.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают способы доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA в клетки с применением векторов, и такие векторы могут находиться в фармацевтически приемлемом векторе, который может необязательно предусматривать матрикс для обеспечения медленного высвобождения, в который встроен вектор доставки генов. В некоторых вариантах осуществления векторы для доставки AGT-специфической dsRNA могут продуцироваться рекомбинантными клетками, а фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки AGT-специфической dsRNA.

Фармацевтические композиции, содержащие средства на основе AGT-специфической dsRNA или ssRNA

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение фармацевтических композиций, содержащих средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, могут применяться в

способах по настоящему изобретению для снижения экспрессии гена AGT и активности AGT в клетке и могут применяться для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT. Такие фармацевтические композиции могут быть составлены с учетом режима доставки. Неограничивающие примеры составов для различных режимов доставки включают: композиции, составленные для подкожного введения, композиции, составленные для системного введения путем парентерального введения, композиции, составленные для внутривенного (IV) введения, композиции, составленные для интратекального введения, и композиции, составленные для прямой доставки в мозг, и т. п. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить с помощью одного или нескольких способов доставки для средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в клетки, например: местного (например, посредством трансдермального пластыря); легочно, например, путем вдыхания или инсуффляции порошка или аэрозоля, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеального, интраназального, эпидермального и трансдермального, перорального или парентерального. Парентеральное введение предусматривает: внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожное введение, например, с помощью имплантированного устройства; или внутрочерепное введение, например интрапаренхиматозное, интратекальное или интравентрикулярное. Средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида также могут доставляться непосредственно в ткани-мишени, например непосредственно в печень, непосредственно в почки и т. п. Следует понимать, что “доставка средства на основе AGT-специфической dsRNA” или “доставка средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида” в клетку предусматривает доставку средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида соответственно, экспрессию средства на основе AGT-специфической dsRNA непосредственно в клетке, а также экспрессию средства на основе AGT-специфической dsRNA из кодирующего вектора, доставленного в клетку, или любое подходящее средство, которое обеспечивает присутствие средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в клетке. Получение и применение составов и средств для доставки ингибирующей РНК хорошо известны и широко применяются в данной области техники.

При использовании в данном документе “фармацевтическая композиция” содержит фармацевтически эффективное количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин “фармацевтически приемлемый носитель” относится к носителю, используемому для введения терапевтического средства. Такие носители включают без ограничения солевой раствор, забуференный солевой раствор, глюкозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации.

Этот термин конкретным образом исключает среды для культивирования клеток. Для лекарственных средств, вводимых перорально, фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как инертные разбавители, разрыхлители, связующие вещества, смазывающие вещества, подсластители, вкусоароматические вещества, красящие вещества и консерванты. Подходящие инертные разбавители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция и лактозу, тогда как кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются подходящими разрыхлителями. Связующие вещества могут включать крахмал и желатин, тогда как смазывающие вещества, если они присутствуют, обычно представляют собой стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. При необходимости таблетки могут быть покрыты таким материалом, как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат для задержки абсорбции в желудочно-кишечном тракте. Средства, которые включают в фармацевтические составы, дополнительно описаны ниже. При использовании в данном документе термины, такие как “фармакологически эффективное количество”, “терапевтически эффективное количество” и “эффективное количество”, относятся к количеству средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, которое обеспечивает достижение предусмотренного фармакологического, терапевтического результата или результата в виде предупреждения. Например, если данное клиническое лечение считается эффективным при снижении с его помощью измеряемого параметра, связанного с заболеванием или нарушением, на по меньшей мере 10%, то терапевтически эффективное количество лекарственного средства, применяемого для лечения этого заболевания или состояния, представляет собой количество, необходимое для обеспечения снижения этого параметра на по меньшей мере 10%. Например, терапевтически эффективное количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида может обеспечить снижение уровня полипептида AGT на по меньшей мере 10%. Фармацевтические композиции могут содержать dsRNAi-средства, в том числе дуплексы, такие как AD00051 - AD00122-19-2, AD00163-3, AV01227 - AVAV01257 и AV01711, представленные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные dsRNAi-средства включают, например, дуплексы AD00158, AD00163, AD00159, AD00290, AD00300 или AD00122. В других вариантах осуществления предпочтительные dsRNAi-средства включают, например, AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1 или AD00300-1. В некоторых других вариантах осуществления такие dsRNAi-средства включают варианты дуплексов, например варианты дуплексов AD00158, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 или AD00122.

Эффективные количества

В некоторых аспектах способы по настоящему изобретению включают приведение клетки в контакт с эффективным количеством средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида с

целью снижения экспрессии гена AGT в клетке, приведенной в контакт. Определенные варианты осуществления способов по настоящему изобретению включают введение субъекту средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в количестве, эффективном для снижения экспрессии гена AGT и лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT у субъекта. При применении для целей снижения экспрессии AGT и/или для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT, “эффективное количество” представляет собой количество, необходимое или достаточное для реализации необходимого биологического эффекта. Например, эффективное количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, может представлять собой количество, требующееся для: (i) замедления или остановки прогрессирования заболевания или состояния; (ii) обращения вспять, снижения или устранения одного или нескольких симптомов заболевания или состояния. В некоторых аспектах настоящего изобретения эффективное количество представляет собой количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, которое при введении субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, приводит к терапевтическому ответу, обеспечивающему предупреждение и/или лечение заболевания или состояния. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, эффективное количество представляет собой количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, которое при комбинированном или совместном введении с другим терапевтическим средством лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, обеспечивает терапевтический ответ, обеспечивающему предупреждение и/или лечение заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологический эффект лечения субъекта средством на основе AGT-специфической dsRNA или средством на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению может заключаться в облегчении и/или полном устранении симптомов, вызванных заболеванием или состоянием, ассоциированными с AGT. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологический эффект заключается в полном исчезновении заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, например, подтвержденном диагностическим тестом, показывающим, что у субъекта отсутствует заболевание или состояние, ассоциированные с AGT. Неограничивающие примеры поддающихся выявлению физиологических симптомов включают снижение накопления липидов в печени субъекта после введения средства по настоящему изобретению. Другие известные из уровня техники средства оценки статуса заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, могут применяться для выявления эффекта средств и/или способов по настоящему изобретению в отношении заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT.

Эффективное количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, которое обеспечивает снижение активности полипептида AGT до уровня, необходимого для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, обычно определяется в ходе клинических испытаний, в которых эффективная доза устанавливается в слепом исследовании для испытуемой популяции по сравнению с контрольной популяцией. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, которое обеспечивает необходимый ответ, такой как снижение выраженности заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, в клетках, тканях и/или организмах субъектов, страдающих от заболевания или состояния. Соответственно, эффективное количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, поддающегося лечению путем снижения активности полипептида AGT, может представлять собой количество, которое при введении обеспечивает снижение активности полипептида AGT у субъекта до уровня ниже того, который присутствовал бы в клетке, ткани и/или организме субъекта при отсутствии введения средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида. В определенных аспектах настоящего изобретения уровень активности полипептида AGT и/или экспрессии гена AGT в клетках, тканях и/или организмах субъектов, которые не подвергались воздействию или введению средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, называется “контрольным” количеством. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению контрольное количество для субъекта представляет собой количество до лечения субъекта, другими словами, уровень у субъекта до введения средства AGT может быть контрольным уровнем субъекта и применяться для сравнения с уровнем активности полипептида AGT и/или экспрессии гена AGT у субъекта после введения ему siRNA. В случае лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT необходимый ответ может заключаться в снижении выраженности или устранении одного или нескольких симптомов заболевания или состояния в клетках, тканях и/или организме субъекта. Снижение или устранение могут быть временным или постоянным. Следует понимать, что способы определения активности полипептида AGT, экспрессии гена AGT, оценки симптомов, клинического тестирования и т. п. можно применять для мониторинга статуса заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. В некоторых аспектах настоящего изобретения необходимым ответом на лечение заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, является задержка или даже предупреждение возникновения заболевания или состояния.

Эффективное количество соединения, которое обеспечивает снижение активности полипептида AGT, также может быть определено путем оценки физиологических эффектов введения средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в отношении клетки или субъекта,

например, снижения выраженности заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, после введения. Анализы и/или мониторинг симптомов у субъектов можно применять для определения эффективности средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению (которые можно вводить в составе фармацевтических соединений по настоящему изобретению) и для определения наличия ответа на лечение. Неограничивающим примером является один или несколько тестов на артериальное давление, известных в данной области техники. Другой неограничивающий пример заключается в том, что до и после лечения субъекта средством на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению проводят один или несколько тестов для определения артериального давления, известных в данной области техники, чтобы определить статус нарушения, ассоциированного с AGT, у субъекта. В другом неограничивающем примере для определения статуса заболевания, ассоциированного с AGT, у субъекта применяют один или несколько известных в данной области техники тестов для снижения уровня артериального давления. В данном примере заболевание включает гипертензию, и тест предназначен для определения снижения уровня артериального давления у субъекта до и после лечения средством на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают способы определения эффективности средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению при введении субъекту для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, путем оценки и/или мониторинга одной или больше “физиологических характеристик” заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта. Неограничивающими примерами физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, являются уровень AGT в сыворотке крови, среднее артериальное давление и диастолическое артериальное давление у субъекта. Стандартные способы определения таких физиологических характеристик известны в данной области техники и включают без ограничения анализы крови, исследования с визуализацией, физикальные обследования и т. п.

Следует понимать, что количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, вводимого субъекту, можно модифицировать на основании, по меньшей мере частично, таких результатов определения статуса заболевания и/или состояния и/или физиологических характеристик, определенных субъектом. Терапевтическое количество может быть изменено, например, путем изменения композиции, в которой вводят средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, путем изменения пути введения, путем изменения времени введения и так далее для увеличения или снижения количества средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида.

Эффективное количество средства на основе АГТ-специфической dsRNA или средства на основе АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида будет изменяться в зависимости от конкретного состояния, в отношении которого осуществляют лечение, возраста и состояния здоровья субъекта, которому предоставляют лечение, тяжести состояния, продолжительности лечения, природы совместно принимаемых средств лечения (если таковые имеются), конкретного пути введения и других факторов, находящихся в пределах знаний и опыта практикующего врача. Например, эффективное количество может зависеть от необходимого уровня активности полипептида АГТ и/или экспрессии гена АГТ, эффективного для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с АГТ. Опытный специалист может эмпирическим путем определить эффективное количество конкретного средства на основе АГТ-специфической dsRNA или средства на основе АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида для применения в способах по настоящему изобретению без излишних экспериментов. В соответствии с изложенными в данном документе сведениями, выбирая из различных средств на основе АГТ-специфической dsRNA или средств на основе АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению и учитывая такие факторы, как эффективность, относительная биодоступность, вес тела пациента, тяжесть нежелательных побочных эффектов и предпочтительный режим введения, можно разработать эффективную профилактическую или терапевтическую схему лечения для эффективного лечения конкретного субъекта. Как используется в вариантах осуществления настоящего изобретения, эффективное количество средства на основе АГТ-специфической dsRNA или средства на основе АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению может представлять собой количество, которое обеспечивает получение необходимого биологического эффекта в клетке при приведении в контакт с ним.

Следует понимать, что сайленсинг гена АГТ можно осуществлять конститутивно или с помощью геномного конструирования в любой клетке, экспрессирующей АГТ, и определять с помощью любого подходящего анализа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия гена АГТ снижается на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% за счет введения средства на основе АГТ-специфической dsRNA по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия гена АГТ снижается на 5% - 10%, 5% - 25%, 10% - 50%, 10% - 75%, 25% - 75%, 25% - 100% или 50% - 100% за счет введения средства на основе АГТ-специфической dsRNA по настоящему изобретению.

Введение дозы

Средства на основе АГТ-специфической dsRNA и средства на основе АГТ-специфического антисмыслового полинуклеотида предоставляются в фармацевтических композициях в дозировках, достаточных для того, чтобы подавить экспрессию генов АГТ. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения доза средства на основе АГТ-специфической dsRNA или средства на основе АГТ-специфического антисмыслового

полинуклеотида составляет от 0,01 до 200,0 мг на килограмм веса тела реципиента в день, обычно от 1 до 50 мг/кг веса тела, от 5 до 40 мг/кг веса тела, от 10 до 30 мг/кг веса тела, от 1 до 20 мг/кг веса тела, от 1 до 10 мг/кг веса тела или от 4 до 15 мг/кг веса тела в день включительно. Например, каждое отдельное введение средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида может быть осуществлено в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг, 2,6 мг/кг, 2,7 мг/кг, 2,8 мг/кг, 2,9 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,1 мг/кг, 3,2 мг/кг, 3,3 мг/кг, 3,4 мг/кг, 3,5 мг/кг, 3,6 мг/кг, 3,7 мг/кг, 3,8 мг/кг, 3,9 мг/кг, 4 мг/кг, 4,1 мг/кг, 4,2 мг/кг, 4,3 мг/кг, 4,4 мг/кг, 4,5 мг/кг, 4,6 мг/кг, 4,7 мг/кг, 4,8 мг/кг, 4,9 мг/кг, 5 мг/кг, 5,1 мг/кг, 5,2 мг/кг, 5,3 мг/кг, 5,4 мг/кг, 5,5 мг/кг, 5,6 мг/кг, 5,7 мг/кг, 5,8 мг/кг, 5,9 мг/кг, 6 мг/кг, 6,1 мг/кг, 6,2 мг/кг, 6,3 мг/кг, 6,4 мг/кг, 6,5 мг/кг, 6,6 мг/кг, 6,7 мг/кг, 6,8 мг/кг, 6,9 мг/кг, 7 мг/кг, 7,1 мг/кг, 7,2 мг/кг, 7,3 мг/кг, 7,4 мг/кг, 7,5 мг/кг, 7,6 мг/кг, 7,7 мг/кг, 7,8 мг/кг, 7,9 мг/кг, 8 мг/кг, 8,1 мг/кг, 8,2 мг/кг, 8,3 мг/кг, 8,4 мг/кг, 8,5 мг/кг, 8,6 мг/кг, 8,7 мг/кг, 8,8 мг/кг, 8,9 мг/кг, 9 мг/кг, 9,1 мг/кг, 9,2 мг/кг, 9,3 мг/кг, 9,4 мг/кг, 9,5 мг/кг, 9,6 мг/кг, 9,7 мг/кг, 9,8 мг/кг, 9,9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, 21 мг/кг, 22 мг/кг, 23 мг/кг, 24 мг/кг, 25 мг/кг, 26 мг/кг, 27 мг/кг, 28 мг/кг, 29 мг/кг, 30 мг/кг, 31 мг/кг, 32 мг/кг, 33 мг/кг, 34 мг/кг, 35 мг/кг, 36 мг/кг, 37 мг/кг, 38 мг/кг, 39 мг/кг, 40 мг/кг, 41 мг/кг, 42 мг/кг, 43 мг/кг, 44 мг/кг, 45 мг/кг, 46 мг/кг, 47 мг/кг, 48 мг/кг, 49 мг/кг до 50 мг/кг веса тела.

При определении дозировки и времени доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению можно учитывать различные факторы. Абсолютное количество доставленного средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида будет зависеть от множества факторов, включая совместно принимаемое средство лечения, количество доз и параметры конкретного субъекта, включая возраст, физическое состояние, размер и вес. Эти факторы хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники и могут быть учтены посредством осуществления обычных экспериментов. В некоторых вариантах осуществления можно применить максимальную дозу, т. е. самую высокую безопасную дозу, полученную по результатам тщательной медицинской оценки.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут предусматривать введение субъекту 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше доз средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида. В некоторых случаях доза фармацевтического соединения (например, предусматривающего средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида) может вводиться субъекту по меньшей мере один раз в день, один раз в два дня, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц и т. д. Дозу можно вводить один или более

одного раза в день, например 2, 3, 4, 5 или больше раз в течение периода продолжительностью 24 часа. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить один раз в день; или средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно вводить в виде двух, трех или больше частей дозы через соответствующие промежутки времени в течение дня, или даже с применением непрерывной инфузии или доставки с помощью состава с контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят субъекту один или несколько раз в день, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц или один или несколько раз в год.

В определенных аспектах способы по настоящему изобретению предусматривают введение фармацевтического соединения отдельно, в комбинации с одним или несколькими другими средствами на основе AGT-специфической dsRNA или средствами на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида и/или в комбинации с другими видами терапии с использованием лекарственных средств или лечебными мероприятиями или схемами, которые вводят субъекту, страдающему от заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. Фармацевтические соединения можно вводить в форме фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции, применяемые в способах по настоящему изобретению, могут быть стерильными и содержать такое количество средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, которое будет обеспечивать снижение активности полипептида AGT до уровня, достаточного для получения необходимого ответа, в единице веса или объема, применимого для введения субъекту. Дозировка фармацевтической композиции, содержащей средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, которую вводят субъекту для снижения активности белка AGT, может быть выбрана в зависимости от различных параметров, в частности от применяемого режима введения и состояния субъекта. Другие факторы включают продолжительность необходимого лечения. Если ответ субъекта на начальную дозу недостаточен, может быть введена более высокая доза (или доза может быть эффективно увеличена посредством применения другого, более локального пути доставки), при условии, что это переносится пациентом.

Лечение

При использовании в данном документе термин “предупреждение” или “предупреждать”, если он используется в отношении заболевания, нарушения или соответствующего состояния, для которых благоприятным является снижение экспрессии гена AGT, означает, что у субъекта снижается вероятность развития симптомов, ассоциированных с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например симптомов, вызванных активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS), таких как гипертензия, или ассоциированных с ними. В таких ситуациях вероятность развития гипертензии снижается: например, предупреждение считается эффективным, если

у индивидуума имеется один или несколько факторов риска развития гипертензии, но гипертензия не развивается или развивается только менее тяжелая гипертензия, или не развивается заболевание или состояние, или уровень развития симптомов, ассоциированных с таким заболеванием или состоянием снижается (например, снижение по шкале оценки заболевания или состояния на по меньшей мере 10% в клинических условиях) по сравнению с популяцией с теми же факторами риска, не получающей лечение, описанное в данном документе, или задерживается проявление симптомов (например, на дни, недели, месяцы или года).

На основании среднего значения надлежащим образом измеренных показателей артериального давления в положении сидя, собранных в течение двух или больше визитов, у субъекта с нормальным артериальным давлением систолическое артериальное давление составляет приблизительно 90-119 мм рт. ст. (приблизительно 12-15,9 кПа (кН/м²)), а диастолическое артериальное давление - приблизительно 60-79 мм рт. ст. (приблизительно 8,0-10,5 кПа (кН/м²)). У субъектов с предгипертензией систолическое артериальное давление составляет приблизительно 120-139 мм рт. ст. (приблизительно 16,1-18,5 кПа (кН/м²)) и диастолическое артериальное давление составляет приблизительно 60-79 мм рт. ст. (приблизительно 8,0-10,5 кПа (кН/м²)); у субъектов с гипертензией (например, гипертензией стадии I) систолическое артериальное давление составляет приблизительно 140-159 мм рт. ст. (приблизительно 18,7-21,2 кПа (кН/м²)) и диастолическое артериальное давление составляет приблизительно 90-99 мм рт. ст. (приблизительно 12,0-13,2 кПа (кН/м²)); у субъектов с гипертензией (например, гипертензией II стадии) систолическое артериальное давление составляет приблизительно ≥ 160 мм рт. ст. (приблизительно $\geq 21,3$ кПа (кН/м²)) и диастолическое артериальное давление составляет приблизительно ≥ 100 мм рт. ст. (приблизительно $\geq 13,3$ кПа (кН/м²)).

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с ангиотензиногеном, представляют собой первичную гипертензию. “Первичная гипертензия” развивается под воздействием факторов окружающей среды или генетических факторов (например, развивается без очевидной медицинской причины, являющейся ее причиной).

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с ангиотензиногеном, представляют собой вторичную гипертензию. “Вторичная гипертензия” характеризуется наличием поддающегося определению состояния, являющегося ее причиной, и может характеризоваться наличием нескольких вариантов этиологии, включая причины, ассоциированные с почками, сосудами и эндокринной системой, например, заболевание с поражением паренхимы почек (например, поликистоз почек, гломерулярное или интерстициальное заболевание), заболевание с поражением сосудов почек (например, стеноз почечной артерии, фиброзномышечная дисплазия), эндокринные нарушения (например, избыток адренокортикоидов или минералокортикоидов, феохромоцитома, гипертиреоз или гипотиреоз, избыток гормона роста, гиперпаратиреоз), коарктацией аорты или применением оральных контрацептивов.

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с ангиотензиногеном, представляют собой гипертонический криз, как, например, злокачественную гипертензию или прогрессирующую гипертензию. “Прогрессирующая гипертензия” означает сильное повышение артериального давления (т. е. систолическое артериальное давление, составляющее 180 мм рт. ст. или больше, или диастолическое артериальное давление, составляющее 110 мм рт. ст. или больше), сопровождающееся прямым повреждением одного или нескольких конечных органов. Для предупреждения дальнейшего повреждения органов необходимо немедленно снизить артериальное давление. “Злокачественная гипертензия” означает сильно повышенное артериальное давление (т. е. систолическое артериальное давление, составляющее 180 мм рт. ст. или больше, или диастолическое артериальное давление, составляющее 110 мм рт. ст. или больше), сопровождающееся прямым повреждением одного или нескольких конечных органов и отеком диска зрительного нерва. Для предупреждения дальнейшего повреждения органов необходимо немедленно снизить артериальное давление. Повреждение нервных окончаний вследствие неконтролируемого артериального давления может включать гипертоническую энцефалопатию, инсульт/инфаркт головного мозга, субарахноидальное кровоизлияние и/или внутричерепное кровоизлияние. Повреждение конечных органов сердечно-сосудистой системы может включать ишемию/инфаркт миокарда, острую дисфункцию левого желудочка, острый отек легких и/или расслоение аорты. Другие системы органов также могут пострадать от неконтролируемой гипертензии, что может привести к острой почечной недостаточности/отказу почек, ретинопатии, эклампсии или микроангиопатической гемолитической анемии.

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с ангиотензиногеном, представляет собой острую гипертензию. “Острая гипертензия” означает тяжелое повышение артериального давления (т. е. систолическое артериальное давление, составляющее 180 мм рт. ст. или больше, или диастолическое артериальное давление, составляющее 110 мм рт. ст. или больше) без прямого повреждения одного или нескольких органов. Артериальное давление можно безопасно понизить за нескольких часов.

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с ангиотензиногеном, представляет собой гипертензию беременных, такую как хроническая гипертензия беременности, гестационная гипертензия, преэклампсия, эклампсия, преэклампсия, наложенная на хроническую гипертензию, HELLP-синдром и гипертензия, вызванная беременностью (также называемая преходящей гипертензией при беременности, хронической гипертензией во второй половине беременности и гипертензией, вызванной беременностью (PIH)). Субъект с “хронической гипертензией беременности” представляет собой субъекта, чье артериальное давление превышает 140/90 мм рт. ст. до беременности или до 20 недель беременности. “Гестационная гипертензия” или “гипертензия, вызванная беременностью” относится к гипертензии, которая развивается на поздних сроках беременности (более 20 недель беременности) без каких-либо других признаков

преэклампсии и возвращается к норме после родов. “Легкая преэклампсия” определяется как два эпизода гипертензии (артериальное давление $\geq 140/90$ мм рт. ст.), возникшие с разницей в по меньшей мере шесть часов у женщины с нормальным артериальным давлением до 20 недель беременности, но без признаков повреждения конечных органов. У субъектов с уже существующей первичной гипертензией преэклампсия диагностируется, если систолическое артериальное давление повышается на 30 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление повышается на 15 мм рт. ст. “Тяжелая преэклампсия” определяется как наличие одного из следующих признаков или симптомов преэклампсии: два эпизода систолического артериального давления 160 мм рт. ст. или выше или диастолического артериального давления 110 мм рт. ст. или выше с разницей в по меньшей мере 6 часов; протеинурия более 5 г, полученная за 24 часа, или более 3+ в двух выборочных образцах мочи, полученных с разницей в по меньшей мере 4 часа; отек легких или цианоз; олигурия (<400 мл за 24 часа); постоянная головная боль, боль в эпигастриальной области и/или нарушение функции печени; тромбоцитопения, олигогидрамниоз, снижение роста плода или разрыв плаценты. “Эклампсия” определяется как судороги, которые нельзя отнести к другим причинам у женщин с преэклампсией. “HELLP-синдром” (также известный как отек-протеинурия-гипертензия-гестоз типа В) означает гемолиз, повышение уровня печеночных ферментов и снижение уровня тромбоцитов у беременных субъектов.

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с ангиотензиногеном, представляет собой резистентную гипертензию. “Резистентная гипертензия” означает артериальное давление, которое остается выше целевого (например, 140/90 мм рт. ст.), несмотря на одновременное применение трех различных классов антигипертензивных лекарственных средств, одним из которых является тиазидный диуретик. Субъекты, которые контролировали свое артериальное давление с помощью четырех или более лекарственных препаратов, также считаются страдающими резистентной гипертензией.

Заболевания или состояния, ассоциированные с AGT, при которых снижение уровня и/или активности полипептида AGT является эффективным для лечения заболевания или состояния, можно подвергать лечению с помощью способов и средств на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению для подавления экспрессии AGT. Примеры заболеваний и состояний, которые можно подвергать лечению средствами на основе AGT-специфической dsRNA или средствами на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению и способами лечения по настоящему изобретению, включают без ограничения: гипертоническую болезнь, гипертензию, пограничную гипертензию, первичную гипертензию, вторичную гипертензию, изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию, ассоциированную с беременностью, диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефрактерную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию, гипертензию Голдблатта, внутриглазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную

гипертензию, систолическую гипертензию, нестабильную гипертензию, гипертоническую болезнь сердца, гипертоническую нефропатию, атеросклероз, артериосклероз, сосудистое заболевание, диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую кардиомиопатию, гломерулосклероз, стеноз аорты, аневризму аорты, фиброз желудочков, сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, заболевания почек, почечную недостаточность, системный склероз, внутриутробную задержку роста (IUGR) и задержку развития плода. Такие заболевания и состояния могут упоминаться в данном документе как “заболевания или состояния, ассоциированные с AGT” и “заболевания и состояния, вызванные и/или модулируемые AGT”.

В определенных аспектах настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению может быть введено субъекту за один или несколько раз до или после диагностики заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъект подвержен риску возникновения или развития заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. Субъект, подверженный риску развития заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, представляет собой субъекта, у которого повышена вероятность развития заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, по сравнению с контрольным значением риска развития заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения уровень риска является статистически значимым по сравнению с контрольным уровнем риска. К субъектам группы риска могут относиться, например: субъект, у которого уже есть или появится фоновое заболевание и/или генетическое отклонение, при котором субъект более подвержен развитию заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, чем контрольный субъект без такого фонового заболевания или генетического отклонения; субъекты с семейной и/или личной историей заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT; и субъекты, которые ранее получали лечение от заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT. Следует понимать, что фоновое заболевание и/или генетическое отклонение, повышающие восприимчивость субъекта к заболеванию или состоянию, ассоциированным с AGT, может представлять собой заболевание или генетическое отклонение, которые, если они присутствуют, ранее были определены как связанные с более высокой вероятностью развития заболевания или состояния, ассоциированных с AGT.

Следует понимать, что средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно вводить субъекту в зависимости от состояния здоровья конкретного субъекта. Например, медицинский персонал, оказывающий медицинскую помощь субъекту, может оценить уровень AGT, измеренный в образце, полученном от субъекта, и определить, что желательным является снизить уровень AGT субъекта путем введения средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по

настоящему изобретению. В одном неограничивающем примере биологический образец, такой как образец крови или сыворотки крови, может быть получен от субъекта, и в образце может быть определен уровень AGT у субъекта. Введение субъекту средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, и получение образца крови или сыворотки крови от субъекта после введения, и применение образца для определения уровней AGT, и сравнение результатов с образцом, полученным от субъекта до введения дозы (предыдущим). Снижение уровней AGT у субъекта в следующих образцах по сравнению с уровнями до введения дозы свидетельствует об эффективности средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в снижении уровней AGT у субъекта. В одном неограничивающем примере артериальное давление может считаться физиологической характеристикой связанного с AGT нарушения, даже если у субъекта не было диагностировано связанное с AGT нарушение, такое как раскрытое в данном документе. Медицинский работник может отслеживать изменения артериального давления у субъекта в качестве показателя эффективности средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления способов по настоящему изобретению предусматривают модификацию лечения, предусматривающего введение субъекту средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, основанную, по меньшей мере частично, на оценке изменения одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения влияние средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, введенного субъекту, может быть определено и использовано для модуляции количества средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, вводимого впоследствии субъекту. В одном неограничивающем примере субъекту вводят средство на основе dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, определяют артериальное давление у субъекта после введения, и на основании, по меньшей мере частично, определенных уровней определяют, требуется ли большее количество средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида для усиления физиологического эффекта введенного средства, например, понижения или дальнейшего понижения артериального давления у субъекта. В другом неограничивающем примере субъекту вводят средство на основе dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, определяют артериальное давление у субъекта после введения, и, по меньшей мере частично, основываясь на определенных уровнях, предполагают введение меньшего количества средства на основе dsRNA или

средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида.

Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают оценку изменений одной или нескольких физиологических характеристик, возникших в результате предшествующего лечения субъекта, для регулирования количества средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, вводимого субъекту впоследствии. Некоторые варианты осуществления способов по настоящему изобретению включают 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше процедур определения физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT; оценку и/или мониторинг эффективности введенного средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению; и необязательно применение определенных результатов для регулирования одного или нескольких из дозировки, схемы введения доз и/или частоты введения дозы средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению необходимым результатом введения субъекту эффективного количества средства на основе dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению является снижение артериального давления у субъекта по сравнению с предыдущим уровнем артериального давления, определенным у субъекта, или артериальным давлением в пределах диапазона нормального артериального давления.

При использовании в данном документе термины “лечение”, “терапевтический” или “лечить” при использовании в отношении заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, могут относиться к профилактическому лечению, которое обеспечивает снижение вероятности развития у субъекта заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, а также может относиться к лечению после того, как у субъекта развилось заболевание или состояние, ассоциированные с AGT, с целью устранения или снижения уровня заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, предупреждению усугубления заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, и/или замедлению прогрессирования заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта по сравнению с субъектом в отсутствие терапии, направленной на снижение активности полипептида AGT у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления средства, композиции и способы по настоящему изобретению можно применять для подавления экспрессии гена AGT. При использовании в данном документе в отношении экспрессии гена AGT термины “подавлять”, “обеспечивать сайленсинг”, “снижать”, “регулировать с понижением функции” и “обеспечивать нокдаун” означают изменение экспрессии гена AGT, например, посредством одного или нескольких из перечисленного: уровень РНК, транскрибируемой с гена, уровень активности экспрессированного AGT и уровень полипептида, белка или белковой субъединицы AGT, транслируемых с мРНК, в клетке, группе клеток, ткани,

органе или субъекте, в которых транскрибируется ген AGT, которые уменьшаются, если клетка, группа клеток, ткань, орган или субъект подвергаются воздействию (например, лечению) средством на основе AGT-специфической dsRNA или средством на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, по сравнению с контрольным уровнем РНК, транскрибируемой с гена AGT, уровнем активности экспрессируемого AGT или уровнем AGT, транслируемого с мРНК, соответственно. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень представляет собой уровень в клетке, ткани, органе или субъекте, которые не подвергались воздействию (например, лечению) средством на основе AGT-специфической dsRNA или средством на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида.

Способы введения

В способах по настоящему изобретению можно применять различные пути введения средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида. Выбор конкретного режима доставки будет зависеть, по меньшей мере частично, от конкретного заболевания, в отношении которого осуществляют лечение, и дозировки, необходимой для достижения терапевтической эффективности. В целом, способы по настоящему изобретению можно осуществлять на практике с применением любого режима введения, который является приемлемым с медицинской точки зрения, то есть любого режима, который обеспечивает эффективные терапевтические уровни для заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT, не вызывая клинически неприемлемых побочных эффектов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно вводить пероральным, энтеральным, мукозальным, подкожным и/или парентеральным путем. Термин “парентеральный” включает подкожную, внутривенную, интратекальную, внутримышечную, внутрибрюшинную и интратермальную методики введения или инфузии. Другие пути включают без ограничения назальный (например, через гастроnazальную трубку), трансдермальный, вагинальный, ректальный, сублингвальный и ингаляционный. Пути доставки по настоящему изобретению могут включать интратекальный, интравентрикулярный или внутрочерепной. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида может быть размещено в матриксе для обеспечения замедленного высвобождения и вводиться путем размещения матрикса в субъекте. В некоторых аспектах настоящего изобретения средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида могут быть доставлены в клетки субъекта с применением наночастиц, покрытых средством для доставки, которое нацеливается на определенные клетки или органеллы. Различные режимы доставки, способы и реагенты известны в данной области техники. Неограничивающие примеры способов доставки и средств для доставки представлены в других местах в данном документе. В некоторых аспектах настоящего

изобретения термин “доставка” в отношении средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида может относиться к введению одной или нескольких “голых” последовательностей средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в клетку или субъекту. В определенных аспектах настоящего изобретения “доставка” означает введение в клетку или субъект путем трансфекции, доставку клетки, содержащей средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, субъекту, или доставку вектора, кодирующего средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, в клетку и/или организм субъекта и т. п. Доставка средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида с применением трансфекции может включать введение вектора в клетку и/или организм субъекта.

В некоторых способах по настоящему изобретению одно или несколько средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно вводить в форме препарата или в фармацевтически приемлемом растворе, который обычно может содержать фармацевтически приемлемые концентрации солей, буферов, консервантов, совместимых носителей, адъювантов и необязательно других терапевтических ингредиентов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида может быть составлено с другим терапевтическим средством для одновременного введения. Согласно способам по настоящему изобретению, средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно вводить в форме фармацевтической композиции. Как правило, фармацевтические композиции содержат средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида и необязательно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники. При использовании в данном документе фармацевтически приемлемый носитель относится к нетоксичному материалу, который не оказывает отрицательного влияния на эффективность биологической активности активного ингредиента (например, способность средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида подавлять экспрессию гена AGT в клетке или организме субъекта). Различные способы введения и доставки средств на основе dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида для терапевтического применения известны в данной области техники и их можно применять в способах по настоящему изобретению.

Фармацевтически приемлемые носители включают разбавители, наполнители, соли,

буферы, стабилизаторы, солюбилизаторы и другие материалы, известные в данной области техники. Типичные фармацевтически приемлемые носители описаны в патенте США № 5211657, и другие носители известны специалистам в данной области техники. Как правило, такие препараты могут содержать соли, буферы, консерванты, совместимые носители и необязательно другие терапевтические средства. При применении в медицине соли должны быть фармацевтически приемлемыми, однако соли, отличные от фармацевтически приемлемых, можно успешно применять для получения фармацевтически приемлемых солей и они не исключаются из объема настоящего изобретения. Такие фармакологически и фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли, полученные из следующих кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, серной, азотной, фосфорной, малеиновой, уксусной, салициловой, лимонной, муравьиной, малоновой, янтарной и тому подобных. Кроме того, фармацевтически приемлемые соли могут быть получены в виде солей щелочных металлов или щелочноземельных металлов, например солей натрия, калия или кальция.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривается введение одного или нескольких средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида непосредственно в ткань. В некоторых вариантах осуществления ткань, в которую вводят соединение, представляет собой ткань, в которой присутствует или может возникнуть заболевание или состояние, ассоциированные с AGT, неограничивающимися примерами таких тканей являются печень или почки. Прямая доставка лекарственного средства в ткани может быть достигнута с помощью прямой инъекции или другими средствами. Многие перорально доставляемые соединения естественным образом попадают в печень и почки и проходят через них, и некоторые варианты осуществления способов лечения по настоящему изобретению предусматривают пероральное введение субъекту одного или нескольких средств на основе AGT-специфической dsRNA. Средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами можно вводить однократно или их можно вводить несколько раз. При введении несколько раз средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно вводить разными путями. Например, хотя этот вариант и не является ограничивающим, первое (или несколько первых) введение можно осуществлять подкожно, а одно или несколько дополнительных введений могут быть пероральными и/или системными.

Для вариантов осуществления настоящего изобретения, в которых необходимым является системное введение средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, средство на основе AGT-специфической dsRNA или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида могут быть составлены для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Инъекционные препараты

могут быть представлены в виде единичной лекарственной формы, такой как ампулы или многодозовые контейнеры, с добавлением консервантов или без них. Составы, содержащие средство на основе AGT-специфической dsRNA (также известные как фармацевтические композиции), могут иметь форму суспензий, растворов или эмульсий в маслянистых или водных носителях и могут содержать средства для составления, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства.

Составы для парентерального введения содержат стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевой раствор и буферные среды. Носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и хлорида натрия, лактированный раствор Рингера или нелетучие масла. Вспомогательные вещества для внутривенного введения включают жидкости и биологически активные добавки, электролитные добавки (например, на основе раствора декстрозы Рингера) и т. п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т. д. При других формах введения, например, при внутривенном введении, дозы будут ниже. Если ответ субъекта на начальную дозу не является удовлетворительным, может быть введена более высокая доза (или доза может быть эффективно увеличена посредством применения другого, более локализованного пути доставки), при условии, что это переносится пациентом. При необходимости можно применять несколько доз в день для достижения соответствующих системных или местных уровней одного или нескольких средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида и для достижения соответствующего снижения активности белка AGT.

В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают применение носителя для доставки, такого как биосовместимая микрочастица, наночастица или имплантат, применимый для имплантации реципиенту, такому как субъект. Типичные биоразлагаемые имплантаты, которые можно использовать в соответствии со способом по настоящему изобретению, описаны в публикации согласно PCT WO 95/24929 (включена в данный документ посредством ссылки), где описывается биосовместимый, биоразлагаемый матрикс для размещения биологической макромолекулы.

Для доставки субъекту одного или нескольких средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в способах по настоящему изобретению можно применять полимерные матрицы, как не являющиеся биоразлагаемыми, так и являющиеся биоразлагаемыми. В некоторых вариантах осуществления матрикс может быть биоразлагаемым. Полимеры матрикса могут быть природными или синтетическими. Полимер может быть выбран в

зависимости от периода времени, в течение которого необходимо высвобождение, обычно от нескольких часов до года или больше. Как правило, доступны варианты высвобождения за период от нескольких часов до трех-двенадцати месяцев. Полимер необязательно находится в форме гидрогеля, который может абсорбировать приблизительно 90% своего веса в воде, и необязательно дополнительно сшивается с многовалентными ионами или другими полимерами.

Как правило, средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно доставлять с помощью биоразлагаемых имплантатов путем диффузии из полимерного матрикса или его разрушения. Типичные синтетические полимеры для этой цели хорошо известны в данной области техники. Для доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида можно применять полимеры, являющиеся биоразлагаемыми и не являющиеся биоразлагаемыми, используя известные в данной области техники способы. Биоадгезивные полимеры, такие как биоразлагаемые гидрогели (H. S. Sawhney, C. P. Pathak и J. A. Hubell в *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587), также можно применять для доставки средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. Другие подходящие системы доставки могут включать системы доставки с высвобождением по времени, отсроченным высвобождением или медленным высвобождением. Такие системы могут обеспечивать избегание повторного введения средств на основе AGT-специфической dsRNA или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, что повышает удобство для субъектов и медицинских работников. Существует множество типов систем высвобождения, известных специалистам средней квалификации в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5075109, 4452775, 4675189, 5736152, 3854480, 5133974 и 5407686). Кроме того, доступны аппаратные системы доставки на основе насосов, некоторые из которых также подходят для имплантации.

Применение имплантатов длительного действия с медленным высвобождением может быть целесообразно для профилактического лечения субъектов и субъектов, подверженных риску развития рецидивирующих заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT. При использовании в данном документе долгосрочное высвобождение относится к имплантатам, сконструированным и устроенным так, чтобы доставлять терапевтические уровни средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида в течение вплоть до по меньшей мере 10 дней, 20 дней, 30 дней, 60 дней, 90 дней, шести месяцев, одного года или дольше. Имплантаты длительного действия с медленным высвобождением хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники и включают некоторые из описанных выше систем высвобождения.

Терапевтические составы, содержащие средства на основе AGT-специфической

dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, можно получить и применять для хранения путем смешивания молекулы или соединения, характеризующихся необходимой чистотой, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами [Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition (2006)] в форме лиофилизированного состава или водного раствора. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиента в применяемых дозах и концентрациях и включают: буферы, такие как фосфаты, цитраты и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, стеарилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутанол и бензиловый спирт или парабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) пептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкоза, манноза или декстрин; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, цинк-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN®, PLURONICS® или полиэтиленгликоль (PEG).

Клетки, субъекты и контроли

Способы по настоящему изобретению можно применять в отношении клеток, тканей, органов и/или субъектов. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъект представляет собой человека или позвоночное млекопитающее, включая без ограничения собак, кошек, лошадей, крупный рогатый скот, коз, мышей, крыс и приматов, таких как обезьяны. Соответственно, настоящее изобретение можно применять для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT, у людей и субъектов, отличных от человека. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъект может представлять собой сельскохозяйственное животное, животное из зоопарка, одомашненное или неодомашненное животное, и способы по настоящему изобретению можно применять в схемах для предупреждения и терапии в ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект представляет собой человека, и способы по настоящему изобретению можно применять в профилактических и терапевтических схемах у людей.

Неограничивающими примерами субъектов, в отношении которых может быть применено настоящее изобретение, являются субъекты с диагнозом, подозрением на наличие или риском развития заболевания или состояния, ассоциированных с более высоким, чем требуется, уровнем экспрессии и/или активности AGT, что также называется “повышенными уровнями экспрессии AGT”. Неограничивающие примеры заболеваний и

состояний, ассоциированных с более высокими, чем требуется, уровнями экспрессии и/или активности AGT, описаны в других местах в данном документе. Способы по настоящему изобретению можно применять в отношении субъектов, которые на момент лечения были диагностированы как страдающие данным заболеванием или состоянием, субъектов, ассоциированных с более высоким, чем требуется, уровнем экспрессии и/или активности AGT, или субъектов, которые считаются подверженными риску развития заболеваний или состояний, ассоциированных с более высокими, чем требуется, уровнями экспрессии и/или активности AGT. В некоторых аспектах настоящего изобретения заболевание или состояние, ассоциированные с более высокими, чем требуется, уровнями экспрессии и/или активности AGT, представляют собой острое заболевание или состояние; в определенных аспектах настоящего изобретения заболевание или состояние, ассоциированные с более высокими, чем требуется, уровнями экспрессии и/или активности AGT, представляют собой хроническое заболевание или состояние.

В неограничивающем примере средство на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению вводят пациенту с диагнозом гипертензия, включая первичную гипертензию, вторичную гипертензию, гипертонический криз (такой как злокачественная гипертензия или прогрессирующая гипертензия, острая гипертензия, гипертензия беременных и резистентная гипертензия). Способы по настоящему изобретению можно применять в отношении субъектов, у которых на момент лечения было диагностировано наличие заболевания или состояния, или которые считаются подверженными риску развития заболевания или состояния, или у которых развивается заболевание или состояние.

В другом неограничивающем примере средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению вводят для лечения заболевания или нарушения, вызванных или ассоциированных с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS), или симптома или прогрессирования такового в ответ на заболевание или нарушение, при которых RAAS инактивируется. Термин “заболевание, связанное с ангиотензиногеном” включает заболевания, нарушения или состояния, в отношении которых снижение экспрессии AGT оказывает благоприятный эффект. Такие заболевания обычно связаны с высоким артериальным давлением. Неограничивающие примеры заболеваний, связанных с ангиотензиногеном, включают гипертензию, например, пограничную гипертензию (также известную как предгипертензия), первичную гипертензию (также известную как первичная гипертензия или идиопатическая гипертензия), вторичную гипертензию (также известную как неидиопатическая гипертензия), изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию беременных (эго, преэклампсия, эклампсия и послеродовая преэклампсия), диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефрактерную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию (также называемую почечной гипертензией), гипертензию Голдблатта, внутриглазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную гипертензию,

систолическую гипертензию, нестабильную гипертензию, гипертоническую болезнь сердца, гипертоническую нефропатию, атеросклероз, артериосклероз, сосудистые заболевания (включая заболевания периферических сосудов), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую кардиомиопатию, гломерулосклероз, коарктацию аорты, аневризму аорты, фиброз желудочков сердца, апноэ во сне, сердечную недостаточность (например, систолическую дисфункцию левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, заболевания почек (например, хроническую болезнь почек или диабетическую нефропатию, необязательно на фоне беременности), почечную недостаточность (например, хроническую почечную недостаточность), когнитивные нарушения (например, болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления нарушения, ассоциированные с AGT, включают внутриутробную задержку роста (IUGR) и задержку развития плода.

Клетки, в отношении которых может быть применен способ по настоящему изобретению, включают клетки, пребывающие *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. Клетки могут находиться в субъекте, в культуре и/или в суспензии, или в любом другом подходящем состоянии или условиях. Клетки, в отношении которых может быть применен способ по настоящему изобретению, могут представлять собой следующие: клетки печени, гепатоциты, кардиомиоциты, клетки поджелудочной железы, клетки сердечно-сосудистой системы, клетки почек или другие типы клеток позвоночных, включая клетки человека и млекопитающих, отличных от человека. В определенных аспектах настоящего изобретения клетки, в отношении которых можно применять способы по настоящему изобретению, представляют собой здоровые нормальные клетки, в отношении которых отсутствуют данные о том, что они являются клетками, пораженными заболеванием. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции по настоящему изобретению применяются в отношении клеток печени, гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток поджелудочной железы, клеток сердечно-сосудистой системы и/или клеток почек. В определенных аспектах настоящего изобретения контрольные клетки представляют собой нормальные клетки, однако следует понимать, что клетки, пораженные заболеванием или состоянием, также можно применять в качестве контрольных клеток в определенных обстоятельствах, как, например, в случае сравнения результатов, полученных для обработанных клеток, пораженных заболеванием или состоянием, и необработанных клеток, пораженных заболеванием или состоянием.

Согласно способам по настоящему изобретению, уровень активности полипептида AGT может быть определен и сравнен с контрольным уровнем активности полипептида AGT. Контролем может быть заранее определенное значение, которое может принимать различные формы. Это может быть одно значение отсечения, такое как медиана или среднее значение. Оно может быть установлено на основании сравнения групп, например, в группе с нормальными уровнями полипептида AGT и/или активности полипептида AGT и в группе с повышенными уровнями полипептида AGT и/или активности полипептида AGT. Другим

неограничивающим примером группы сравнения может быть популяция с одним или несколькими симптомами или диагнозом заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, которую сравнивают с популяцией, у которой отсутствует один или несколько симптомов или диагноз заболевания или состояния, или группа субъектов, которым было введено средство лечения на основе siRNA по настоящему изобретению, которую сравнивают с группой субъектов, которым средство лечения на основе siRNA по настоящему изобретению не было введено. Как правило, в качестве контроля могут использоваться внешне здоровые нормальные индивидуумы или внешне здоровые клетки в соответствующей возрастной группе. Следует понимать, что в дополнение к заранее определенным значениям, контроль согласно настоящему изобретению может представлять собой образец материала, тестируемый параллельно с экспериментальным материалом. Примеры включают образцы из контрольных популяций или контрольные образцы, полученные путем изготовления для тестирования параллельно с экспериментальными образцами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контроли могут включать клетки или субъекты, которые не подвергались воздействию или лечению средством на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению, и в этом случае контрольные уровни полипептидов AGT и/или активности полипептида AGT можно сравнивать с уровнями полипептида AGT и/или активности полипептида AGT в клетке или организме субъекта, которые были подвергнуты воздействию средством на основе AGT-специфической dsRNA или средством на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контрольный уровень может представлять собой уровень полипептида AGT, определенный для субъекта, с которым сравниваются уровни полипептида AGT, определенные для одного и того же субъекта в разное время. В одном неограничивающем примере уровни AGT определяют в биологических образцах, полученных от субъектов, которые не получали лечение в отношении AGT по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой образец сыворотки крови. Уровень полипептида AGT, определенный в образце, полученном от субъекта, может служить в качестве исходного или контрольного значения для субъекта. После одного или нескольких введений средства на основе AGT-специфической dsRNA субъекту в рамках способа лечения по настоящему изобретению можно получить один или несколько дополнительных образцов сыворотки крови, и уровни полипептида AGT в последующих одном или нескольких образцах можно сравнить с контрольными/исходными уровнями у субъекта. Такие сравнения можно применять для оценки начала, прогрессирования или ремиссии заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта. Например, уровень полипептида AGT в исходном образце, полученном от субъекта, который превышает уровень, полученный от того же субъекта после введения субъекту средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, свидетельствует о ремиссии заболевания или

состояния, ассоциированных с AGT, и указывает на эффективность введенных средств на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению в лечении заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT.

В определенных аспектах настоящего изобретения один или несколько из уровней полипептида AGT и/или активности полипептида AGT, определенных для субъекта, могут служить в качестве контрольного значения для последующего сравнения уровней полипептида AGT и/или активности AGT у того же субъекта, что позволяет оценить изменения по сравнению с “исходным уровнем” активности полипептида AGT у субъекта. Поэтому, если начальный уровень используется в качестве контрольного уровня для субъекта, начальный уровень полипептида AGT и/или исходный уровень активности полипептида AGT можно применять для установления и/или определения способности способов и соединений по настоящему изобретению снижать уровень полипептида AGT и/или активности полипептида AGT у данного субъекта.

При применении способов по настоящему изобретению субъекту может быть введено средство на основе AGT-специфической dsRNA и/или средство на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению. Такие dsRNAi-средства включают, например, дуплексы AD00051 - AD00122-19-2, AD00163-3, AV01227 - AVAV01257 и AV01711, представленные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные dsRNAi-средства включают, например, дуплексы AD00158, AD00163, AD00163-3.AD00159, AD00290, AD00300 или AD00122. В других вариантах осуществления предпочтительные dsRNAi-средства включают, например, AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1 или AD00300-1. В некоторых других вариантах осуществления такие dsRNAi-средства включают варианты дуплексов, например варианты дуплексов AD00158, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 или AD00122. Эффективность введения и лечения по настоящему изобретению может быть оценена по сравнению с уровнями полипептида AGT в образцах сыворотки крови, полученными от субъекта до введения дозы в предыдущие моменты времени, или с контрольными уровнями, полученными без воздействия (например, уровнем полипептида AGT в контрольном образце сыворотки крови). При введении и лечении уровень полипептида AGT в образце сыворотки крови, полученной от субъекта, снижается на по меньшей мере 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше. Следует понимать, что как уровень полипептида AGT, так и уровень активности полипептида AGT связаны с уровнем экспрессии гена AGT. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают введение субъекту средства на основе AGT-специфической dsRNA и/или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полипептида по настоящему изобретению в количестве, эффективном для подавления экспрессии гена AGT, с обеспечением таким образом снижения уровня полипептида AGT и снижения уровня активности полипептида AGT у субъекта.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают определение наличия, отсутствия и/или количества (также обозначаемого в данном

документе как уровень) полипептида AGT в одном или нескольких биологических образцах, полученных от одного или нескольких субъектов. Такое определение может быть применено для оценки эффективности способов лечения по настоящему изобретению. Например, способы и композиции по настоящему изобретению можно применять для определения уровня полипептида AGT в биологических образцах, полученных от субъектов, ранее прошедших лечение с введением средства на основе AGT-специфической dsRNA и/или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полипептида по настоящему изобретению. Снижение уровня полипептида AGT в образце сыворотки крови после введения и лечения на по меньшей мере 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с уровнем полипептида AGT в образцах сыворотки крови, полученных от субъекта до введения в предыдущий момент времени, или по сравнению с контрольным уровнем, полученным без воздействия (например, уровнем полипептида AGT в контрольном образце сыворотки крови), указывает на уровень эффективности лечения, предоставляемого субъекту.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения физиологические характеристики заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, определенные для субъекта, можно применить в качестве контрольного результата, и определение физиологических характеристик одного и того же субъекта в разные моменты времени сравнивают с контрольными результатами. В одном неограничивающем примере артериальное давление (и/или другие физиологические характеристики связанного с AGT заболевания или состояния) измеряют у субъекта, которому никогда не вводили AGT-специфическое средство лечения по настоящему изобретению, что может быть применено в качестве исходного или контрольного значения для субъекта. После одного или нескольких введений субъекту средства на основе AGT-специфической dsRNA в ходе лечения в соответствии со способом лечения по настоящему изобретению измеряют артериальное давление и сравнивают его с контрольными/исходными уровнями у субъекта соответственно. Такие сравнения можно применять для оценки начала, прогрессирования или ремиссии заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта. Например, полученное для субъекта значение артериального давления на исходном уровне, которое выше, чем значение артериального давления, измеренное у того же субъекта после введения субъекту средства на основе AGT-специфической dsRNA или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению, свидетельствует о ремиссии заболевания или нарушения, ассоциированных с AGT, и подтверждает эффективность введения средства на основе AGT-специфической dsRNA по настоящему изобретению в лечении заболеваний или состояний, ассоциированных с AGT.

В некоторых аспектах настоящего изобретения определенное для субъекта значение одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или нарушения, ассоциированных с AGT, может служить контрольным значением для последующего сравнения с физиологическими характеристиками того же субъекта, что позволяет оценить изменения “исходных” физиологических характеристик у субъекта. Таким образом, можно

получить начальный физиологический профиль у индивидуума, измерить начальный физиологический профиль, измеряемый в качестве контроля для данного субъекта, и показать и/или определить эффект от применения способов и соединений по настоящему изобретению в целях снижения уровня полипептида AGT и/или активности полипептида AGT у данного индивидуума. При применении способов по настоящему изобретению средства на основе AGT-специфической dsRNA и/или средства на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида по настоящему изобретению можно вводить субъекту в количестве, эффективном для лечения связанных с AGT заболеваний или состояний. Эффективность введения и лечения по настоящему изобретению может быть оценена путем определения изменений в одной или нескольких физиологических характеристиках связанных с AGT заболеваний или состояний. В одном неограничивающем примере артериальное давление у субъекта снижается по сравнению с артериальным давлением, полученным у субъекта в предыдущий момент времени, или по сравнению с контрольным артериальным давлением, которое не подвергалось воздействию, на по меньшей мере 0,5 мм рт. ст., 1 мм рт. ст., 2 мм рт. ст., 3 мм рт. ст., 4 мм рт. ст., 5 мм рт. ст., 6 мм рт. ст., 7 мм рт. ст., 8 мм рт. ст., 9 мм рт. ст., 10 мм рт. ст., 11 мм рт. ст., 12 мм рт. ст., 13 мм рт. ст., 14 мм рт. ст., 15 мм рт. ст., 16 мм рт. ст., 17 мм рт. ст., 18 мм рт. ст., 19 мм рт. ст., 20 мм рт. ст. или больше, пока артериальное давление у субъекта не вернется нормальному диапазону.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают определение наличия, отсутствия и/или изменений физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, с помощью таких способов, как без ограничения следующие: (1) измерение артериального давления субъекта; (2) оценка физиологических характеристик в одном или нескольких биологических образцах, полученных от одного или нескольких субъектов; (3) или физикальное обследование субъекта. Такое определение может быть применено для оценки эффективности способов лечения по настоящему изобретению.

Наборы

Наборы, содержащие одно или несколько средств на основе AGT-специфической dsRNA и/или средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида и инструкции по их применению в способах по настоящему изобретению, также входят в объем настоящего изобретения. Наборы по настоящему изобретению могут содержать одно или несколько из средства на основе AGT-специфической dsRNA, средства на основе AGT-специфического смыслового полинуклеотида и AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, применимых для лечения заболевания или состояния, ассоциированных с AGT. Наборы, содержащие одно или несколько средств на основе AGT-специфической dsRNA, средств на основе AGT-специфического смыслового полинуклеотида и средств на основе AGT-специфического антисмыслового полинуклеотида, могут быть получены для применения в способах лечения по настоящему изобретению. Компоненты наборов по настоящему изобретению могут быть упакованы в водной среде или в лиофилизированной

форме. Набор по настоящему изобретению может содержать носитель, разделенный на части для размещения в нем одного или нескольких контейнерных средств или ряда контейнерных средств (таких как пробирки, флаконы, колбы, бутылки, шприцы и т. п.). Первое контейнерное средство или серия контейнерных средств могут содержать одно или несколько соединений, например средство на основе AGT-специфической dsRNA и/или средство на основе AGT-специфического смыслового или антисмыслового полинуклеотида. Второе контейнерное средство или серия контейнерных средств может содержать нацеливающие средства, метящие средства, средства для доставки и т. д., которые могут быть включены в него в качестве части AGT-специфической dsRNA и/или AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов, подлежащих введению в вариантах осуществления способа лечения по настоящему изобретению.

Набор по настоящему изобретению может также содержать инструкции. Инструкции обычно представлены в письменном виде и содержат указания по осуществлению варианта осуществления лечения, предусмотренного набором, и принятию решений на основе этого лечения.

Следующие примеры приведены для иллюстрации конкретных случаев применения на практике настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Для специалиста средней квалификации в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение применимо к различным композициям и способам.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Синтез средств для RNAi

Дуплексы средства для AGT-специфической RNAi, представленные в таблице 2-4 выше, синтезировали в соответствии со следующей общей процедурой.

Последовательности смысловой и антисмысловой нитей siRNA синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов с применением общепризнанного способа твердофазного синтеза на основе химии фосфорамидитов. Увеличения цепи олигонуклеотидов достигали с помощью 4-стадийного цикла: снятие защитной группы, конденсация, кэпирование и стадия окисления или сульфуризации для добавления каждого нуклеотида. Процедуры синтеза осуществляли на твердой подложке, выполненной из стекла с регулируемым размером пор (CPG, 1000 Å). Мономеры фосфорамидитов приобретали из коммерческих источников. Фосфорамидиты с кластерами лигандов на основе GalNAc (GLPA1 и GLPA2 в качестве неограничивающих примеров) синтезировали в соответствии с процедурами, описанными в примерах 2-3 в данном документе. Для siRNA, используемых для скрининга *in vitro* (таблица 2), синтез осуществляли в масштабе 2 мкмоль; для siRNA для тестирования *in vivo* (таблицы 3, 4) процедуры синтеза осуществляли в масштабе 5 мкмоль или больше. В случае, где лиганд на основе GalNAc (GLO-0 в качестве неограничивающего примера) присоединен к 3'-концу смысловой нити, применяли твердую подложку CPG, к которой присоединен лиганд на основе GalNAc. В случае, где лиганд на основе GalNAc (GLS-1 или GLS-2 в качестве неограничивающего примера) присоединен к 5'-концу смысловой нити,

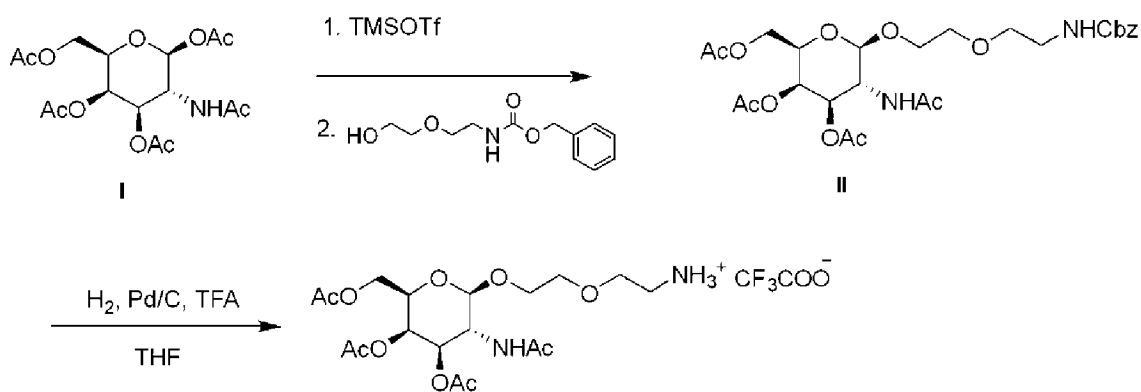


Схема 1

К раствору соединения I (20,0 г, 51,4 ммоль) в 100 мл 1,2-дихлорэтана (DCE) добавляли TMSOTf (17,1 г, 77,2 ммоль). Полученный реакционный раствор перемешивали при 60°C в течение 2 ч, а затем при 25°C в течение 1 ч. Защищенный посредством Cbz 2-(2-аминоэтокси)этан-1-ол (13,5 г, 56,5 ммоль) растворяли в DCE (100 мл), высушивали над 4 Å порошковыми молекулярными ситами (10 г) и добавляли по каплям к вышеуказанному реакционному раствору при 0°C в атмосфере N₂. Полученную реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Реакционную смесь отфильтровывали и промывали насыщенным NaHCO₃ (200 мл), водой (200 мл) и насыщенным солевым раствором (200 мл). Органический слой высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который растирали в порошок с 2-метилтетрагидрофураном/гептаном (5/3, об./об., 1,80 л) в течение 2 часов. Полученную смесь отфильтровывали и высушивали с получением соединения II в виде белого твердого вещества (15,0 г, выход 50,3%).

В сухую и продуваемую аргоном колбу для гидрирования осторожно добавляли 10% Pd/C (1,50 г), затем 10 мл тетрагидрофурана (THF), а затем раствор соединения II (15,0 г, 26,4 ммоль) в THF (300 мл) и TFA (трифторуксусная кислота, 3,00 г, 26,4 ммоль). Полученную смесь дегазировали, трижды продували H₂ и перемешивали при 25°C в течение 3 ч в атмосфере H₂ (45 фунтов на кв. дюйм). Тонкослойная хроматография (TLC, растворитель: DCM:MeOH=10:1) показала полное израсходование соединения II. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в безводном DCM (500 мл) и концентрировали. Этот процесс повторяли три раза с получением промежуточного соединения А в виде пенистого белого твердого вещества (14,0 г, выход 96,5%). ¹H ЯМР (400 МГц DMSO-*d*₆): δ ppm 7,90 (d, *J*=9,29 Гц, 1 H), 7,78 (br s, 3 H), 5,23 (d, *J*=3,26 Гц, 1 H), 4,98 (dd, *J*=11,29, 3,26 Гц, 1 H), 4,56 (d, *J*=8,53 Гц, 1 H), 3,98-4,07 (m, 3 H), 3,79-3,93 (m, 2 H), 3,55-3,66 (m, 5 H), 2,98 (br d, *J*=4,77 Гц, 2 H), 2,11 (s, 3 H), 2,00 (s, 3 H), 1,90 (s, 3 H), 1,76 (s, 3 H).

Промежуточное соединение В синтезировали, используя процедуру, аналогичную синтезу промежуточного соединения А. ¹H ЯМР (400 МГц DMSO-*d*₆): δ ppm 7,90 (br d,

$J=9,03$ Гц, 4 Н), 5,21 (d, $J=3,51$ Гц, 1 Н), 4,97 (dd, $J=11,1$ Гц, 1 Н), 4,54 (d, $J=8,53$ Гц, 1 Н), 3,98-4,06 (m, 3 Н), 3,88 (dt, $J=10,9$ Гц, 1 Н), 3,76-3,83 (m, 1 Н), 3,49-3,61 (m, 9 Н), 2,97 (br s, 2 Н), 2,10 (s, 3 Н), 1,99 (s, 3 Н), 1,88 (s, 3 Н), 1,78 (s, 3 Н). Масса, рассчитанная для $C_{20}H_{34}N_2O_{11}$: 478,22; определено: 479,3 ($M+H^+$).

Пример 3. Синтез фосфорамидитов с кластером лигандов на основе GalNAc - GLPA1, GLPA2 и GLPA15.

Получение GLPA1 и GLPA2 проводили в соответствии со схемой 2 ниже. Начиная с защищенного бензилом пропан-1,3-диамина, алкилирование трет-бутил-2-бромацетатом обеспечивало получение соединения I, представляющего собой триэфир. Удаление защитной группы, представляющей собой бензил, путем гидрирования обеспечивало получение соединения II, представляющего собой вторичный амин. Сочетание амида с 6-гидроксикапроновой кислотой обеспечивало получение соединения III. После обработки HCl в диоксане защитную группу, представляющую собой *трет*-бутил, удаляли с получением соединения IV, представляющего собой триацид. Осуществляли амидное сочетание между соединением IV, представляющим собой триацид, и промежуточным соединением A или промежуточным соединением B с получением соединения Va или Vb. Фосфорамидиты GLPA1 или GLPA2 синтезировали путем фосфорилирования соединений Va или Vb с помощью 2-цианозтил-N,N-диизопропилхлоридфосфорамидита и каталитического количества 1H-тетразола.

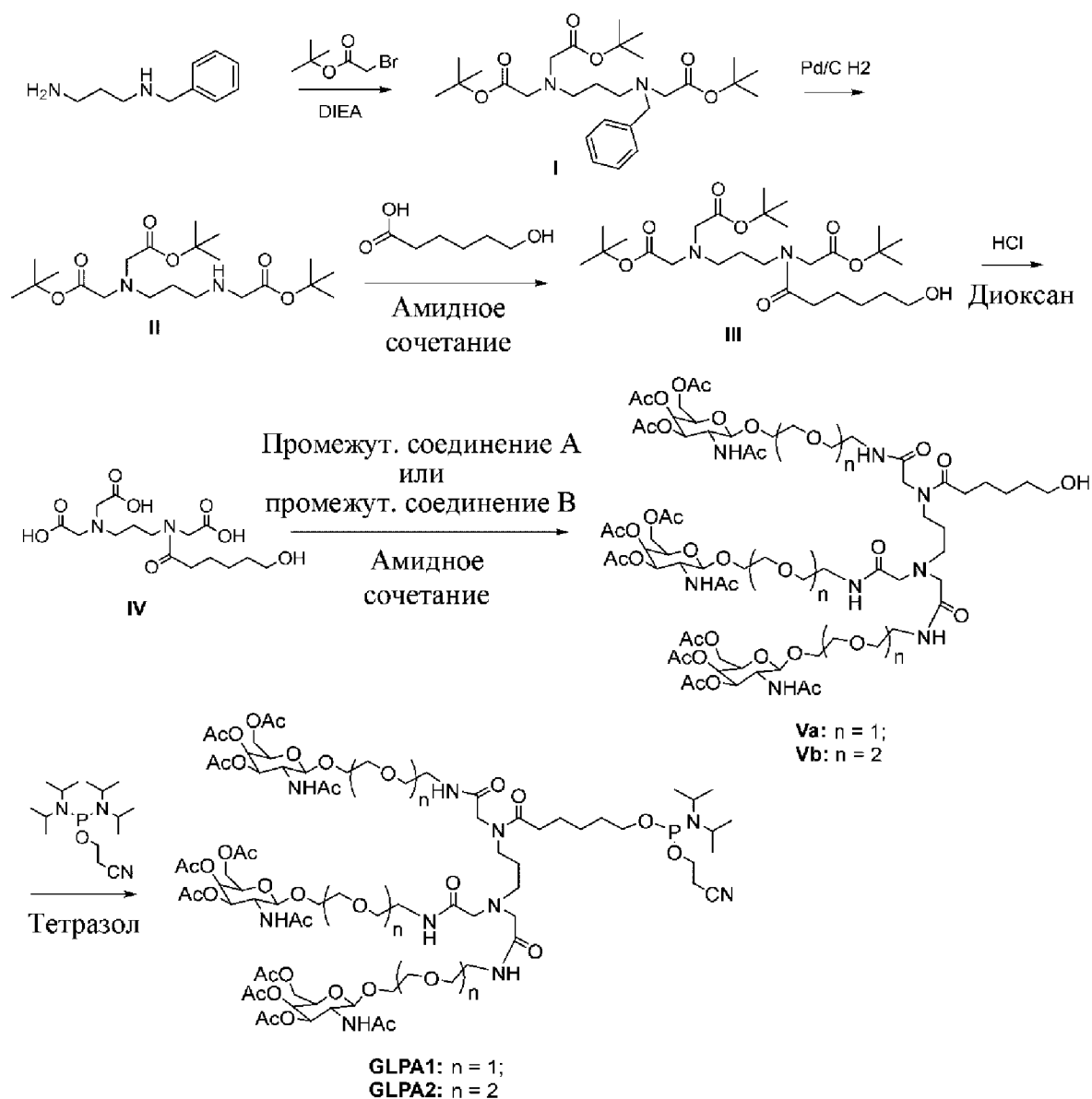


Схема 2

К N-бензил-1,3-пропандиамину (5,00 г, 30,4 ммоль) в диметилформамиде (DMF, 100 мл) добавляли *трет*-бутил-2-бромоацетат (23,7 г, 121 ммоль), а затем по каплям диизопропилэтиламин (DIEA, 23,61 г, 182 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 16 часов. LCMS показала полное израсходование N-бензил-1,3-пропандиамина. Реакционную смесь разбавляли с помощью H₂O (500 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (500 мл×2). Объединенные органические вещества промывали насыщенным солевым раствором (1 л), высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: петролейный эфир: этилацетат от 20:1 до 5:1). Соединение I получали в виде бесцветного масла (12,1 г, выход 78,4%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ ppm 7,26-7,40 (m, 5 H), 3,79 (s, 2 H), 3,43 (s, 4 H), 3,21 (s, 2 H), 2,72 (dt, $J=16,9, 7,34$ Гц, 4 H), 1,70 (quin, $J=7,2$ Гц, 2 H), 1,44-1,50 (m, 27 H).

Сухую емкость для гидрирования продували аргоном три раза. Добавляли Pd/C (200

мг, 10%), затем MeOH (5 мл), затем соединение I (1,00 г, 1,97 ммоль) в MeOH (5 мл). Реакционную смесь дегазировали под вакуумом и снова наполняли H₂. Данный способ повторяли три раза. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов в атмосфере H₂ (15 фунтов на квадратный дюйм). LCMS показала, что соединение I полностью израсходовалось. Реакционную смесь отфильтровывали под пониженным давлением в атмосфере N₂. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения II (655 мг, выход 79,7%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ ppm 3,44 (s, 4 H), 3,31 (s, 2 H), 2,78 (t, J=7,1 Гц, 2 H), 2,68 (t, J=6,9 Гц, 2 H), 1,88 (br s, 1 H), 1,69 (quin, J=7,03 Гц, 2 H), 1,44-1,50 (s, 27 H).

Смесь соединения II (655 мг, 1, 57 ммоль) 6-гидроксикапроновой кислоты (249 мг, 1,89 ммоль), DIEA (1,02 г, 7,86 ммоль), гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI, 904 мг, 4,72 ммоль) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT, 637 мг, 4,72 ммоль) в DMF (6 мл) дегазировали и трижды продували N₂, затем перемешивали в атмосфере N₂ при 25°C в течение 3 часов. LCMS показала наличие необходимого продукта. Реакционную смесь разбавляли с помощью H₂O (10 мл) и экстрагировали с помощью 20 мл EtOAc (10 мл×2). Органические вещества объединяли, промывали насыщенным соевым раствором (20 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: петролейный эфир: этилацетат от 5:1 до 1:1) с получением соединения III (650 мг, выход 77,8%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ ppm 3,90-3,95 (s, 2 H), 3,63 (t, J=6,40 Гц, 2 H), 3,38-3,45 (m, 6 H), 2,72 (t, J=6,65 Гц, 2 H), 2,40 (t, J=7,28 Гц, 2 H), 1,55-1,75 (m, 8 H), 1,44 (s, 27 H). Масса, рассчитанная для C₂₇H₅₀N₂O₈: 530,36; определено: 531,3 (M+H⁺).

Смесь соединения III (5,5 г, 10,3 ммоль) в смеси HCl/диоксан (2 M, 55 мл) перемешивали при 25°C в течение 3 ч. LCMS показала полное израсходование соединения III. Реакционную смесь отфильтровывали, промывали с помощью EtOAc (50 мл) и высушивали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Полученную смесь растворяли в CH₃CN (50 мл) и удаляли летучие вещества под вакуумом. Этот процесс повторяли три раза с получением соединения IV в виде белого твердого вещества (2,05 г, выход 54,5%). ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O): δ ppm 4,21 (s, 1 H), 4,07 (d, J=4,5 Гц, 4 H), 3,99 (s, 1 H), 3,45-3,52 (m, 3 H), 3,42 (t, J=6,5 Гц, 1 H), 3,32-3,38 (m, 1 H), 3,24-3,31 (m, 1 H), 2,37 (t, J=7,4 Гц, 1 H), 2,24 (t, J=7,4 Гц, 1 H), 1,99 (dt, J=15,5, 7,53 Гц, 1 H), 1,85-1,94 (m, 1 H), 1,85-1,94 (m, 1 H), 1,39-1,56 (m, 4 H), 1,19-1,31 (m, 2 H).

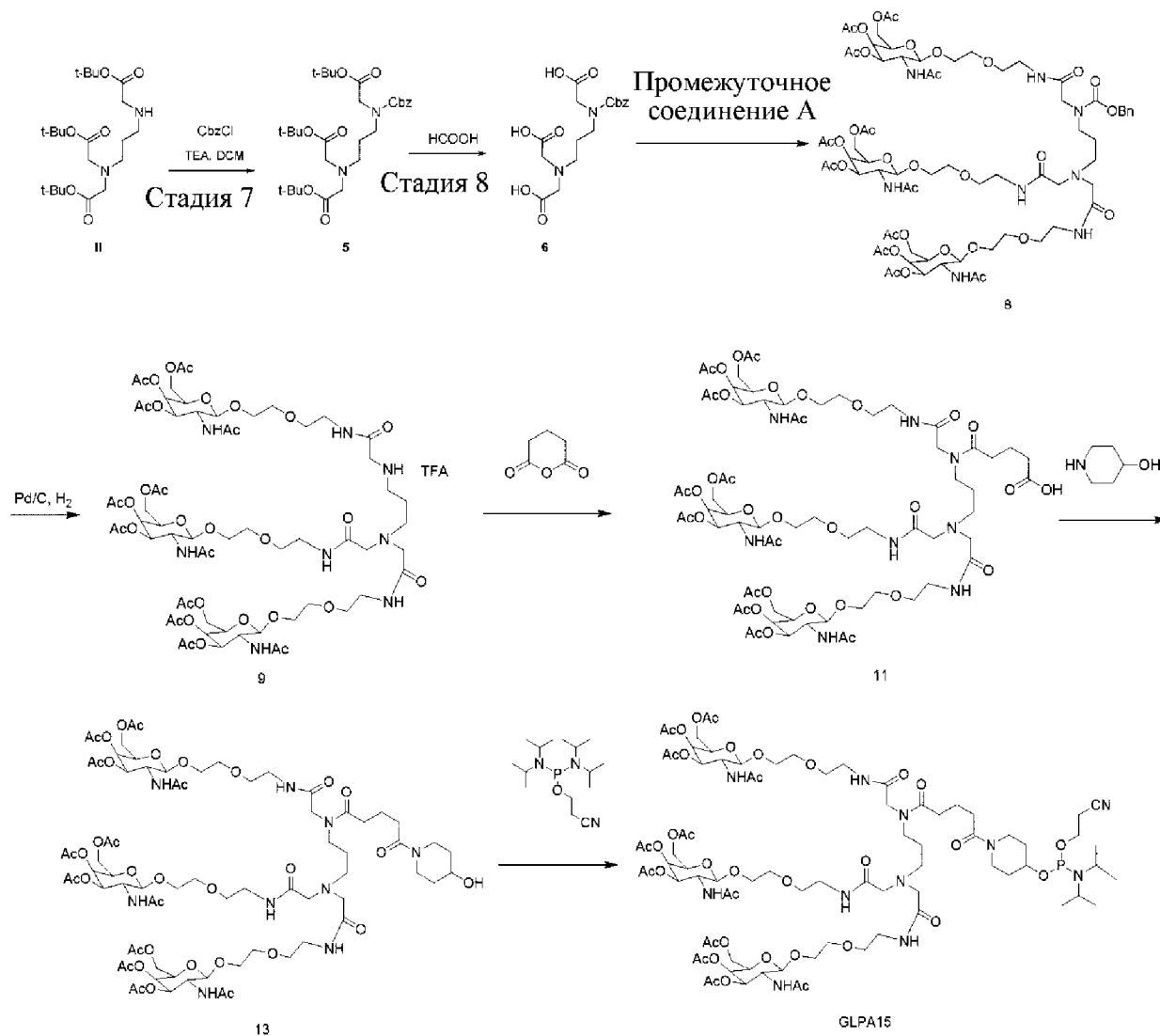
Смесь соединения IV (500 мг, 1,05 ммоль), промежуточного соединения A (2,02 г, 3,67 ммоль), DIEA (813 мг, 6,30 ммоль), EDCI (704 мг, 3,67 ммоль) и HOBT в DMF (10 мл) (496 мг, 3,67 ммоль) дегазировали и трижды продували N₂, после чего смесь перемешивали при 25°C в атмосфере N₂ в течение 3 ч. LCMS показала наличие необходимого соединения. Реакционную смесь охлаждали, добавляя H₂O (10 мл), и экстрагировали с помощью DCM

(10 мл×2). Объединенные органические вещества экстрагировали 10% лимонной кислотой (20 мл). Водную фазу нейтрализовали насыщенным раствором NaHCO_3 и повторно экстрагировали с помощью DCM (10 мл × 2). Органические вещества высушивали над сульфатом натрия, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения Va в виде белого твердого вещества (570 мг, 0,281 ммоль, выход 26,8%). ^1H ЯМР: (400 МГц, CDCl_3) ppm δ 7,84-8,12 (m, 3 H), 6,85-7,15 (m, 2 H), 6,66-6,81 (m, 1 H), 5,36 (br d, $J=2,7$ Гц, 3 H), 5,11-5,27 (m, 3 H), 4,63-4,85 (m, 3 H), 3,90-4,25 (m, 18 H), 3,37-3,75 (m, 28 H), 3,15-3,28 (m, 4 H), 2,64 (br d, $J=6,53$ Гц, 2 H), 2,30-2,46 (m, 2 H), 2,13-2,18 (m, 9 H), 2,05 (s, 9 H), 1,94-2,03 (m, 18 H), 1,68 (br s, 2 H), 1,45 (br s, 2 H), 1,12 (br t, $J=7,0$ Гц, 2 H).

К раствору соединения Va (260 мг, 0,161 ммоль) в безводном DCM (5 мл) добавляли тетразолид диизопропиламмония (30,3 мг, 0,177 ммоль), а затем 3-бис(диизопропиламино)фосфанилоксипропаннитрил (194 мг, 0,645 ммоль) по каплям при температуре окружающей среды в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при температуре от 20 до 25°C в течение 2 часов. LCMS показала, что соединение Va полностью израсходовалось. После охлаждения до -20°C реакционную смесь добавляли к перемешиваемой смеси солевой раствор/насыщенный раствор NaHCO_3 (1:1, 5 мл) при 0°C. После перемешивания в течение 1 минуты добавляли DCM (5 мл), и происходило расслоение. Органический слой промывали смесью солевой раствор/насыщенный водный раствор NaHCO_3 (1:1, 5 мл), высушивали над Na_2SO_4 , отфильтровывали и концентрировали до объема примерно 1 мл. Оставшийся раствор при перемешивании добавляли по каплям к 20 мл метил-*трет*-бутилового эфира (МТБЕ). В результате образовывался белый твердый осадок. Смесь центрифугировали и собирали твердое вещество. Твердое вещество повторно растворяли в 1 мл DCM и осаждали добавлением МТБЕ (20 мл). Твердое вещество снова отделяли центрифугированием. Собранное твердое вещество растворяли в безводном CH_3CN и удаляли летучие вещества. Этот процесс повторяли еще два раза с получением фосфорамидита с лигандом на основе GalNAc - соединения GLPA1 (153 мг, 84,4 мкмоль) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): ppm δ 7,71-8,06 (m, 2 H), 6,60-7,06 (m, 3 H), 5,37 (br d, $J=3,0$ Гц, 3 H), 5,18-5,32 (m, 3 H), 4,70-4,86 (m, 3 H), 3,92-4,25 (m, 18 H), 3,42-3,85 (m, 30 H), 3,25 (m, 4 H), 2,59-2,75 (m, 4 H), 2,27-2,44 (m, 2 H), 2,15-2,20 (s, 9 H), 2,07 (s, 9 H), 1,96-2,03 (m, 18 H), 1,65 (br s, 4 H), 1,44 (br d, $J=7,28$ Гц, 2 H), 1,14-1,24 (m, 12 H). ^{31}P ЯМР (CDCl_3): ppm δ 147,15.

Фосфорамидит с лигандом на основе GalNAc, соединение GLPA2, синтезировали по той же процедуре, за исключением применения промежуточного соединения В. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): ppm δ 7,94-8,18 (m, 1 H), 7,69 (br s, 1 H), 6,66-7,10 (m, 3 H), 5,35 (d, $J=3,5$ Гц, 3 H), 5,07-5,25 (m, 3 H), 4,76-4,86 (m, 3 H), 4,01-4,31 (m, 10 H), 3,91-4,01 (m, 8 H), 3,74-3,86 (m, 4 H), 3,52-3,71 (m, 30 H), 3,42-3,50 (m, 6 H), 3,15-3,25 (m, 4 H), 2,52-2,70 (m, 4 H), 2,22-2,45 (m, 2 H), 2,15-2,22 (s, 9 H), 2,06 (s, 9 H), 1,95-2,03 (m, 18 H), 1,77 (br s, 2 H), 1,58-1,66 (m, 4 H), 1,40 (m, 2 H), 1,08-1,24 (m, 12 H). ^{31}P ЯМР (CDCl_3): ppm δ 147,12.

Для получения GLPA15 использовали схему 3, приведенную ниже.



К раствору промежуточного соединения II (275 г, 660 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (2,75 л) добавляли триэтиламин (133 г, 1,32 моль, 2,00 экв.), затем по каплям добавляли Cbz-Cl (169 г, 990 ммоль, 1,50 экв.). Реакционный раствор перемешивали при 25°C в течение 2 часов, после чего LCMS показала, что соединение II полностью преобразовалось. Реакционный раствор последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (800 мл) и насыщенным солевым раствором (500 мл) и органическую фазу высушивали над безводным Na_2SO_4 . После отфильтровывания для удаления влагопоглотителя, фильтрат концентрировали до сухости. Неочищенный продукт подвергали колоночной хроматографии (SiO_2 , PE/EA=100/1-5/1) с получением соединения 5 в виде бесцветного масла (290 г, 527 ммоль, выход 75,7%). ^1H ЯМР (400 МГц в DMSO-d_6): δ ppm 7,23-7,40 (m, 5 H), 5,00-5,12 (m, 2 H), 3,86-3,95 (m, 2 H), 3,23-3,39 (m, 6 H), 2,55-2,67 (m, 2 H), 1,56-1,64 (m, 2 H), 1,31-1,46 (m, 27 H). MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: 551,6.

К соединению 5 (145 г, 263 ммоль, 1,00 экв.) добавляли HCOOH (2,9 л) и раствор перемешивали при 60°C в течение 12 ч., после чего LCMS показала полное превращение соединения 5. Добавляли 1,5 л толуола и 1,5 л ацетонитрила к реакционному раствору, который концентрировали под пониженным давлением до приблизительно 500 мл. Затем

добавляли смесь толуол/ацетонитрил (1:1, приблизительно 750 мл), после чего концентрировали до приблизительно 500 мл. Затем добавляли ацетонитрил (приблизительно 1000 мл), после чего концентрировали до сухости. Неочищенный продукт перемешивали с 700 мл ацетонитрила при 60°C в течение 2 часов, а затем отфильтровывали. Твердое вещество собирали и высушили с получением белого твердого вещества, соединения 6 (105 г, количественное содержание). ¹H ЯМР (400 МГц в DMSO-d₆): δ ppm 7,26-7,40 (m, 5 H), 5,02-5,10 (m, 2 H), 3,89-4,00 (m, 2 H), 3,36-3,45 (m, 4 H), 3,24-3,34 (m, 2 H), 2,59-2,72 (m, 2 H), 1,40 (s, 2 H). MS (ESI) [M+H]⁺ масса/заряд: 383,0.

К раствору соединения 6 (100 г, 261 ммоль) и промежуточного соединения А (502 г, 915 ммоль, 3,50 экв.) в DMF (1,0 л) добавляли TBTU (327 г, 1,02 моль, 3,90 экв.) и триэтиламин (212 г, 2,09 моль, 8,00 экв.). Реакцию проводили при 25°C в течение 1 часа, после чего LCMS показала полное превращение соединения 6. Реакционный раствор добавляли к 4000 мл воды и экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром (2000 мл дважды) для удаления примесей. Оставшуюся водную фазу экстрагировали дихлорметаном (3000 мл дважды). Фазу дихлорметана последовательно промывали 10% водным раствором лимонной кислоты (2000 мл, разделенные на две промывки), насыщенным NaHCO₃ (2,0 л, разделенные на две промывки) и насыщенным соевым раствором (2,0 л), затем высушивали над безводным Na₂SO₄. Фильтрат отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении с получением белого твердого вещества, соединения 8 (260 г, 159 ммоль, выход 60,9%). ¹H ЯМР (400 МГц в DMSO-d₆): δ ppm 7,99-8,08 (m, 2 H), 7,93 (br d, J=5,50 Гц, 1 H), 7,79-7,86 (m, 3 H), 7,26-7,39 (m, 5 H), 5,22 (d, J=3,13 Гц, 3 H), 4,95-5,08 (m, 5 H), 4,54 (br d, J=8,38 Гц, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,81-3,93 (m, 5 H), 3,76 (br d, J=4,88 Гц, 3 H), 3,44-3,62 (m, 10 H), 3,34-3,43 (m, 6 H), 3,24 (br d, J=6,13 Гц, 7 H), 3,02-3,09 (m, 4 H), 2,40-2,47 (m, 2 H), 2,10 (s, 9 H), 1,99 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,77 (s, 9 H), 1,57-1,68 (m, 2 H). MS (ESI) [M+H]⁺ масса/заряд: 816,4.

Котел для гидрирования объемом 2 л обрабатывали аргоном для обеспечения его инертности, после чего осторожно добавляли сухой Pd/C (9 г), а затем MeOH (50 мл) для увлажнения Pd/C. Затем медленно добавляли раствор соединения 8 (90 г, 55,1 ммоль, 1,00 экв.) и трифторуксусной кислоты (6,29 г, 55,1 ммоль, 1,00 экв.) в MeOH (850 мл) в атмосфере аргона. Смесь дегазировали/вытесняли, добавляя H₂ три раза с целью создания атмосферы водорода, и перемешивали при 25°C в течение 10 часов. LCMS показала полное превращение соединения 8. Pd/C удаляли фильтрованием и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 9 (80 г, выход 90,2%). ¹H ЯМР (400 МГц в DMSO-d₆): δ ppm 9,12 (br s, 2 H), 8,50 (br t, J=5,19 Гц, 1 H), 8,10 (br t, J=5,50 Гц, 2 H), 7,85-7,91 (m, 3 H), 5,22 (d, J=3,25 Гц, 3 H), 4,95-5,01 (m, 3 H), 4,52-4,58 (m, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,84-3,93 (m, 3 H), 3,75-3,83 (m, 3 H), 3,39-3,61 (m, 16 H), 3,23-3,32 (m, 6 H), 3,15-3,18 (m, 3 H), 2,97-3,05 (m, 2 H), 2,54-2,61 (m, 2 H), 2,10 (s, 9 H), 2,00 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,77-1,80 (m, 9 H), 1,70-1,76 (m, 2 H). MS (ESI) [M+H]⁺ масса/заряд: 749,3.

К раствору соединения 9 (270 г, 168 ммоль, 1,00 экв.) и глутарового ангидрида (28,6 г, 252 ммоль, 1,50 экв.) в дихлорметане (2,7 л) добавляли триэтиламин (67,8 г, 672 ммоль,

4,00 экв.) и раствор перемешивали при 25°C в течение 1 часа. LCMS показала, что соединение 9 было полностью преобразовано в соединение 11. К реакционному раствору добавляли 4-гидроксипиперидин (42,4 г, 420 ммоль, 2,50 экв.) и TBTU (107 г, 335 ммоль, 2,00 экв.) и перемешивание продолжали при 25°C в течение 1 часа. LCMS показала полное превращение соединения 11. Реакцию гасили медленным добавлением насыщенного NH₄Cl (3,0 л), слои разделялись, и водную фазу экстрагировали дихлорметаном (2×1000 мл) и объединяли с предыдущей органической фазой. Объединенные органические фазы промывали смесью насыщенного NaHCO₃ (водн.) и насыщенного солевого раствора (3,0 л) в соотношении 1:1, высушивали над безводным Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт растворяли в 1,5 л дихлорметана и добавляли по каплям к метил-*трет*-бутиловому эфиру (7,5 л). Во время добавления по каплям постепенно образовывался полупрозрачный белый осадок. Выпавший осадок отфильтровывали под вакуумом и твердое вещество собирали и высушивали под вакуумом с получением соединения 13 в виде белого твердого вещества (207 г, выход 72,8%). ¹H ЯМР (400 МГц в DMSO-d₆): δ ppm 8,05 (br d, J=2,00 Гц, 2 H), 7,82 (br d, J=7,38 Гц, 3 H), 5,21 (br s, 3 H), 4,98 (br d, J=10,26 Гц, 3 H), 4,72 (br s, 1 H), 4,54 (br d, J=7,88 Гц, 3 H), 4,03 (br s, 9 H), 3,74-3,94 (m, 9 H), 3,45-3,71 (m, 12 H), 3,40 (br s, 6 H), 3,24 (br s, 7 H), 3,07 (br d, J=14,13 Гц, 5 H), 2,91-3,01 (m, 1 H), 2,24-2,44 (m, 5 H), 2,20 (br s, 1 H), 2,10 (s, 9 H), 1,96-2,04 (m, 9 H), 1,89 (br s, 9 H), 1,74-1,81 (m, 9 H), 1,51-1,73 (m, 6 H), 1,07-1,36 (m, 3 H). MS (ESI) [M+H]⁺ масса/заряд: 848,0.

К раствору соединения 13 (200 г, 118 ммоль, 1,00 экв.) и тетразолдиизопропиламмония (8,08 г, 47,2 ммоль, 0,40 экв.) в дихлорметане (2,0 л) добавляли 3-бис(диизопропиламино)фосфанилоксипропаннитрил (53,3 г, 177 ммоль, 1,50 экв.). Реакционный раствор перемешивали при 40°C в течение 2 часов, после чего LCMS показала полное превращение соединения 13. Реакционный раствор промывали смесью насыщенного NaHCO₃ и насыщенного солевого раствора в соотношении 1:1 (2,0 л) и высушивали над безводным Na₂SO₄. Неочищенный продукт, полученный после концентрирования фильтрата, растворяли в дихлорметане (1,2 л) и добавляли по каплям в перемешиваемый метил-*трет*-бутиловый эфир (6,0 л). Суспензию отфильтровывали и осадок на фильтре промывали *трет*-бутиловым эфиром. Твердое вещество собирали и высушивали под вакуумом. Продукт растворяли в дихлорметане (1,0 л) и концентрировали до сухости. Эту процедуру повторяли четыре раза, чтобы удалить остатки *трет*-бутилового эфира и получить GLPA15 (164 г, выход 73,3%). ¹H ЯМР (400 МГц в DMSO-d₆): δ ppm 8,05 (br d, J=6,50 Гц, 2 H), 7,81 (br d, J=9,01 Гц, 3 H), 5,22 (d, J=3,25 Гц, 3 H), 4,98 (dd, J=11,26, 3,25 Гц, 3 H), 4,55 (br d, J=8,50 Гц, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,64-3,97 (m, 12 H), 3,55-3,63 (m, 6 H), 3,50 (br s, 5 H), 3,40 (br d, J=6,13 Гц, 6 H), 3,17-3,30 (m, 9 H), 3,07 (br d, J=14,26 Гц, 4 H), 2,76 (t, J=5,82 Гц, 2 H), 2,18-2,47 (m, 6 H), 2,10 (s, 9 H), 1,99 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,78 (s, 9 H), 1,52-1,74 (m, 6 H), 1,12-1,19 (m, 12 H). ³¹P ЯМР (DMSO-d₆): ppm δ 145,25. MS (ESI) [M+H]⁺ масса/заряд: 1895,7.

В некоторых исследованиях предлагаются способы присоединения нацеливающей

группы, содержащей GalNAc (также называемой в данном документе соединением для доставки с GalNAc), к 5'-концу смысловой нити, которые включают применение фосфорамидита с GalNAc (GLPA1) на последней стадии твердофазного синтеза с использованием процесса синтеза, подобного тому, который применяется при удлинении олигонуклеотидной цепи (т. е. добавление нуклеотидов к 5'-концу смысловой нити), для присоединения к 5'-концу смысловой нити.

В некоторых исследованиях способы присоединения GalNAc-содержащей нацеливающей группы к 3'-концу смысловой нити предусматривают применение GLO-n-содержащей твердой подложки (CPG). В некоторых исследованиях способы присоединения GalNAc-содержащей нацеливающей группы к 3'-концу смысловой нити предусматривают связывание нацеливающей группы с GalNAc с твердой подложкой с CPG посредством сложноэфирной связи и применение полученной CPG с присоединенной нацеливающей группой с GalNAc во время синтеза смысловой нити, в результате чего нацеливающая группа с GalNAc оказывается присоединенной к 3'-концу смысловой нити. Другие соединения, представляющие собой фосфорамидит с GalNAc (GLPAn), также могут быть получены при применении достаточным образом соответствующих промежуточных соединений с помощью способов, аналогичных приведенным в данном документе или хорошо известных в данной области техники, и могут быть присоединены к соответствующему положению дуплекса siRNA в качестве нацеливающей группы.

Пример 4. Скрининг AGT-специфических дуплексов siRNA *in vitro*

Клетки Hep3В подвергали трипсинизации и регулировали до соответствующей плотности, затем высевали в 96-луночные планшеты. Одновременно с посевом клетки трансфицировали тестовой siRNA или контрольной siRNA с помощью Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen-13778-150) в соответствии с рекомендациями производителя. siRNA тестировали в трех повторностях при двух концентрациях (от 0,2 нМ до 1,0 нМ), а контрольную siRNA тестировали в трех повторностях при восьми концентрациях в последовательных 3-кратных разведениях от 4,6 пМ до 10 нМ.

Через двадцать четыре часа после трансфекции среду удаляли, а клетки собирали для выделения РНК. Общую РНК выделяли с применением реагента TRIzol™ (Invitrogen-15596018) в соответствии с инструкцией.

Синтез cDNA проводили с использованием набора PrimeScript™ RT Reagent Kit и gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa-RR047A) в соответствии с инструкцией. cDNA AGT выявляли методом qPCR. Параллельно выявляли cDNA GAPDH в качестве внутреннего контроля. ПЦР осуществляли следующим образом: 30 секунд при 95°C, затем 40 циклов между 10 секундами при 95°C и 30 секундами при 60°C.

Анализ данных

Экспрессию гена AGT в каждом образце определяли методом относительного количественного определения (ОК) с использованием сравнительного метода на основе Ct ($\Delta\Delta Ct$); в этом способе измеряют разницу Ct (ΔCt) между геном-мишенью и геном домашнего хозяйства (GAPDH).

Уравнения приведены ниже:

$\Delta CT = \text{среднее значение Ct гена-мишени} - \text{среднее значение Ct GAPDH}$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{образец}) - \Delta CT (\text{выборочный контроль или контроль Lipofectamine RNAiMax})$

Относительное количественное определение мРНК гена-мишени = $2^{(-\Delta\Delta CT)}$

Процент подавления = $(\text{относительное количественное определение контроля} - \text{относительное количественное определение образца}) / \text{относительное количественное определение контроля} \times 100\%$.

В таблице 5 приведены результаты эксперимента для исследований *in vitro* по подавлению экспрессии AGT с помощью различных средств для AGT-специфической RNAi; используемые двухнитевые последовательности соответствуют соединениям, представленным в таблице 2.

AD № дуплекса	Средний % подавления			
	1 нМ		0,2 нМ	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
AD00051	63,49	5,27	57,80	4,84
AD00053	82,93	1,46	60,04	3,22
AD00054	81,76	0,05	27,18	12,85
AD00055	63,11	2,61	27,67	13,05
AD00056	44,67	3,42	-10,57	8,88
AD00057	38,36	1,00	6,39	2,89
AD00058	-6,34	7,17	-10,93	13,00
AD00059	40,95	2,41	-15,25	11,41
AD00060	41,58	1,21	1,71	1,62
AD00061	34,74	7,07	-52,46	7,61
AD00062	11,16	3,26	-27,82	22,96
AD00063	25,99	1,34	-28,28	34,49
AD00064	48,56	10,83	-22,86	4,06
AD00065	17,68	12,71	-19,42	11,46
AD00066	74,76	0,61	32,99	9,82
AD00067	-15,01	11,39	-70,58	12,60
AD00068	48,42	7,31	10,85	3,85
AD00070	14,21	6,91	-41,65	19,32
AD00071	71,20	0,94	40,90	9,35
AD00072	58,69	3,25	-30,13	4,78

AD00073	23,87	7,61	-10,98	10,03
AD00074	78,21	3,00	-13,57	4,32
AD00075	38,92	2,08	20,51	2,14
AD00076	73,89	1,40	52,43	1,99
AD00077	73,85	1,28	56,13	1,41
AD00078	51,59	4,46	-24,43	20,40
AD00079	90,61	0,61	76,62	5,02
AD00080	88,44	1,14	16,00	15,09
AD00081	88,79	1,96	29,91	20,77
AD00082	77,98	0,45	60,15	10,15
AD00083	-25,46	6,04	-24,08	6,71
AD00084	29,29	3,07	-19,97	13,61
AD00085	54,82	2,64	6,94	4,85
AD00086	61,17	2,03	26,87	16,50
AD00087	52,12	5,08	-42,78	64,89
AD00088	17,16	13,36	-25,66	4,89
AD00090	72,23	5,81	14,30	6,12
AD00091	27,41	2,11	-53,58	26,95
AD00092	78,93	0,53	29,92	2,95
AD00093	80,84	0,97	30,70	14,04
AD00094	57,64	7,56	35,89	9,00
AD00095	63,51	1,25	28,95	12,77
AD00097	81,91	2,26	37,49	7,94
AD00098	74,20	0,29	57,41	2,59
AD00099	53,49	2,05	1,42	22,51
AD00100	88,90	0,91	62,84	5,16
AD00101	66,98	2,39	11,83	13,72

Пример 5. Тестирование AGT-специфических дуплексов siRNA *in vivo*

Для оценки активности siRNA AGT *in vivo* использовали мышей, зараженных AAV, кодирующим человеческий ген AGT (4 мыши на группу). За четырнадцать дней до введения siRNA самок мышей C57BL/6J инфицировали внутривенной инъекцией 1×10^{11} вирусных частиц вектора аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего человеческий ген AGT. В день 0 мышам подкожно вводили путем инъекции однократную дозу 2,5 мг/кг или 3 мг/кг средства на основе AGT-специфической siRNA или PBS. Образцы крови собирали в день 0, перед введением siRNA и в конце дня 7. Концентрацию белка AGT человека

измеряли посредством ELISA-анализа в соответствии с рекомендованным производителем протоколом (IBL America, Human Angiotensinogen ELISA Kit). Процент нокдауна рассчитывали, сравнивая уровни мРНК AGT человека в печени мышей (определяли методом qPCR) или уровни белка AGT человека в образцах плазмы крови в день 7 между группами, обработанными siRNA, и группами, обработанными PBS. Результаты представлены в таблицах 6-9.

Таблица 6 Скрининг для однократной дозы AGT, составляющей 3 мг/кг, на мышах, трансдуцированных AAV с AGT человека; соединения с GalNAc соответствуют по последовательности, химической модификации и доставке таковым, показанным в таблице 3, при этом GLO-0 относится к лиганду для доставки, показанному как GalNAc₃ в работе Jayaprakash et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16958–16961.

ID	Процент нокдауна мРНК AGT человека в печени мыши, измеренная методом qPCR	Процент нокдауна AGT человека в плазме крови мышей, измеренный посредством ELISA
AD00052	86%	67%
AD00113	39%	20%
AD00114	78%	NA
AD00115	81%	NA
AD00116	88%	NA
AD00122	95%	83%
AD00123	89%	76%
AD00124	68%	NA
AD00125	86%	NA
AD00126	92%	62%

NA означает, что тестирование не проводили.

Таблица 7 Скрининг для однократной дозы AGT, составляющей 3 мг/кг, на мышах, трансдуцированных AAV с AGT человека; соединения соответствуют по последовательности, химической модификации и доставке таковым, показанным в таблице 3, при этом GLO-0 относится к лиганду для доставки, показанному как GalNAc₃ в работе Jayaprakash et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16958–16961.

ID	Процент нокдауна мРНК AGT человека в печени мыши, измеренная методом qPCR	Процент нокдауна AGT человека в плазме крови мышей, измеренный посредством ELISA
AD00052	72%	65%
AD00154	37%	NA
AD00155	51%	NA

AD00156	48%	NA
AD00157	71%	NA
AD00158	96%	87%
AD00159	94%	80%
AD00160	68%	NA
AD00161	77%	NA
AD00162	85%	NA
AD00163	94%	81%

NA означает, что тестирование не проводили.

Таблица 8 Скрининг для однократной дозы AGT, составляющей 2,5 мг/кг, на мышах, трансдуцированных AAV с AGT человека; соединения соответствуют по последовательности, химической модификации и доставке таковым, показанным в таблице 3, при этом GLO-0 относится к лиганду для доставки, показанному как GalNAc3 в работе Jayaprakash et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16958–16961.

AD	Процент нокдауна мРНК AGT человека в печени мышы, измеренная методом qPCR
AD00052	73,2%
AD00252	25,9%
AD00257	39,1%
AD00260	42,2%
AD00123	74,2%
AD00284	79,6%
AD00158	92,7%
AD00288	86,9%
AD00163	88,9%
AD00289	66,3%
AD00159	85,7%
AD00290	85,2%
AD00285	26,4%
AD00286	54,1%
AD00287	0,5%
AD00256	72,3%
AD00282	81,5%
AD00283	59,8%

AD00291	-29,9%
AD00292	78,1%
AD00293	17,9%
AD00294	60,8%
AD00298	-14,0%
AD00299	53,2%
AD00300	89,4%
AD00301	-47,3%
AD00302	62,1%

Таблица 9 Скрининг для однократной дозы AGT, составляющей 2,5 мг/кг, на мышях, трансдуцированных AAV с AGT человека; соединения соответствуют по последовательности, химической модификации и доставке таковым, показанным в таблице 3 или таблице 4, при этом GLO-0 относится к лиганду для доставки, показанному как GalNAc3 в работе Jayaprakash et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 16958–16961.

ID	Процент нокдауна AGT человека в плазме крови мышей, измеренный посредством ELISA	Процент нокдауна мРНК AGT человека в печени мыши, измеренная методом qPCR
		NA
AD00158	86%	NA
AD00158-1	85%	NA
AD00158-2	68%	NA
AD00122	83%	84%
AD00159	77%	NA
AD00159-1	77%	90%
AD00163	81%	76%
AD00163-1	89%	90%
AD00300	66%	NA
AD00300-1	69%	69%

NA означает, что тестирование не проводили.

Пример 6. Тестирование AGT-специфических дуплексов siRNA *in vivo*

Чтобы оценить *in vivo* активность AGT-специфической siRNA, в данное исследование были включены 15 самцов яванских макаков (возраст 13-22 года, вес 7-9 кг). Животных случайным образом распределяли на 5 групп по три животных в каждой, и каждому животному подкожно вводили путем инъекции тестовое вещество в дозе 2 мг/кг, при этом применяемое тестовое вещество соответствует соединениям, показанным в

таблице 4 (AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1, AD00300-1).

После голодания в течение ночи кровь собирали в дни -14 (до введения дозы), -7 (до введения дозы), 1 (до введения дозы) и после введения дозы в дни 8, 15, 22, 29, 43, 57, 64, 71, 78, 85 и 92. Собранные образцы крови оставляли при комнатной температуре на по меньшей мере 30 минут для свертывания, а затем центрифугировали при 350 об./мин в течение 10 минут при 4°C. Собранную сыворотку крови (примерно 1,0 мл) переносили в два предварительно промаркированных полипропиленовых флакона с завинчивающейся крышкой (0,5 мл/флакон, один для ELISA-анализа, другой для последующего применения) и хранили в морозильной камере при температуре -80°C до проведения тестирования.

Уровень белка AGT в сыворотке крови определяли посредством ELISA. Процентная доля остатка по сравнению с уровнями AGT в плазме крови обезьян в день 1 показана на фигуре 1.

Пример 7. Скрининг AGT-специфических дуплексов siRNA *in vitro*

Исследования *in vitro* проводили в соответствии со способом из примера 4 и результаты эксперимента представлены в таблице 10.

В таблице 10 приведены результаты эксперимента для исследований *in vitro* подавления экспрессии AGT с помощью различных средств для AGT-специфической RNAi; используемые двухнитевые последовательности соответствуют соединениям, представленным в таблице 2.

AD № дуплекса	Средний % подавления			
	1 нМ		0,2 нМ	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
AV01227	93,57	0,03	85,93	0,60
AV01228	91,34	3,40	82,13	0,53
AV01229	80,82	3,46	56,60	1,35
AV01230	78,49	1,26	39,11	0,04
AV01231	49,54	6,13	0,54	6,09
AV01232	80,88	1,05	53,41	1,59
AV01233	89,59	1,75	75,97	2,40
AV01234	89,20	1,86	73,90	1,12
AV01235	86,81	0,00	70,59	3,93
AV01236	90,40	0,66	79,11	2,11
AV01237	82,94	0,71	67,31	2,28
AV01238	84,52	0,63	71,77	1,19
AV01239	81,62	2,26	65,69	2,63
AV01240	87,57	1,05	73,71	1,72

AV01241	88,57	0,37	75,29	1,65
AV01242	88,03	1,08	76,62	1,46
AV01243	90,29	0,30	82,39	1,85
AV01244	86,57	0,96	75,39	2,98
AV01245	81,30	3,09	68,25	4,27
AV01246	74,37	3,11	55,34	6,77
AV01247	63,44	8,48	39,83	6,91
AV01248	73,97	1,99	48,68	2,50
AV01249	64,97	6,78	12,91	15,95
AV01250	88,45	0,15	70,96	0,83
AV01251	89,94	0,35	72,82	2,77
AV01252	87,26	1,72	65,79	2,21
AV01253	86,71	2,13	66,42	0,25
AV01254	90,45	0,53	81,11	1,59
AV01255	89,78	0,42	83,48	2,51
AV01256	89,36	0,69	78,84	0,72
AV01257	92,88	0,13	85,27	0,49

Пример 8. Тестирование AD00163-3 *in vivo* в модели на мышах с AAV:

После периода адаптации 12 самок мышей C57BL/6J случайным образом распределяли на две группы в соответствии с весом тела: модельная группа (растворитель) и группа AD00163-3 (1 мг/кг). Модель на животных создавали путем введения 1×10^{11} г. в. вируса AAV-AGT в хвостовую вену каждой мыши в день 1, объем инъекции составлял 100 мкл/животное. В день 15 мышам в каждой группе вводили PBS или AD00163-3 из таблицы 4 путем подкожной инъекции в объеме 5 мл/кг. Перед введением в день 15 кровь собирали у каждой мыши через подчелюстную вену и образцы сыворотки крови собирали после центрифугирования. В день 22 всех мышей умертвляли с применением CO₂, цельную кровь собирали путем пункции сердца и образцы сыворотки крови собирали после центрифугирования. Концентрацию белка AGT человека измеряли посредством ELISA-анализа в соответствии с рекомендованным производителем протоколом (IBL America, Human Angiotensinogen ELISA Kit). Процентную долю нокдауна рассчитывали, сравнивая уровни белка AGT, происходящего от человека, в образцах плазмы крови мышей в день 7 (после введения) между группой, обработанной с помощью siRNA, и группой, обработанной с помощью PBS. Полученные данные показали, что обработка с помощью AD00163-3 (1 мг/кг) может обеспечить значительное снижение экспрессии белка AGT человека в сыворотке крови мышей, на 91%.

Пример 9. Тестирование AD00163-3 в модели спонтанной гипертензии на яванских макаках

Десять яванских макак с повышенным артериальным давлением случайным образом распределяли на две группы (по 5 макак в каждой группе) для получения либо солевого раствора, либо AD00163-3 из таблицы 4 при дозе 10 мг/кг. Образцы крови собирали в дни -6 и -2 (до введения дозы) и в дни 2, 7, 14, 21, 28 и 35 (после введения дозы). Значения концентрации AGT в сыворотке крови измеряли посредством ELISA в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, и артериальное давление измеряли с помощью устройства с манжетой для хвоста. Как показано на фигурах 2 и 3, одновременно со снижением уровня AGT в сыворотке крови (снижение на 98% в день 35 после введения), однократная предназначенная для подкожного введения доза AD00163-3, составляющая 10 мг/кг, привела к значительному снижению SBP на 28 мм рт. ст. в день 35 после введения (SBP снизился с исходного уровня 147 мм рт. ст. до 119 мм рт. ст.), тогда как в контрольной группе за тот же период не произошло значительного изменения SBP (SBP изменился от исходного уровня 144 мм рт. ст. до 145 мм рт. ст.). Также наблюдалось значительное снижение среднего и диастолического (MBP и DBP) давления, как показано на фигурах 4 и 5 соответственно.

Эквиваленты Несмотря на то, что в данном документе описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалистам средней квалификации в данной области техники будет понятно, что для осуществления описанных в нем функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ можно применять различные другие средства и/или конструкции, и что каждый из этих вариантов и/или модификаций рассматривается как входящий в объем настоящего изобретения. В целом, специалист в данной области техники легко поймет, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, являются иллюстративными, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретных применений, для которых используются сведения из настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, или они будут способны установить такие эквиваленты посредством осуществления только обычных экспериментов. Поэтому следует понимать, что описанные выше варианты осуществления приведены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов изобретение может быть осуществлено на практике иначе, чем конкретно описано и заявлено. Настоящее изобретение направлено на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, любое объединение двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов также включено в объем настоящего изобретения при условии, что такие признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

Все определения при использовании в данном документе следует понимать как определения из управляющего словаря, определения из документов, включенных путем ссылки, и/или обычные значения определяемых терминов.

Если количественное ограничение не используется в описании и формуле изобретения, это следует понимать как “по меньшей мере один”, если явно не указано обратное.

При использовании в описании и формуле изобретения выражение “и/или” следует понимать как означающее “один или оба” элемента, объединенных таким образом, т. е. в определенных случаях такие элементы встречаются вместе, а в других случаях отдельно. В дополнение к элементам, конкретно обозначенным с использованием “и/или”, могут необязательно присутствовать другие элементы, как связанные, так и не связанные с этими конкретно обозначенными элементами, если явно не указано обратное.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, а также публикации, приведенные или упомянутые в данной заявке, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), подавляющее экспрессию ангиотензиногена (AGT), где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом положения нуклеотидов 2-18 в антисмысловой нити предусматривают область комплементарности РНК-транскрипту AGT, где область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, которые отличаются 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от одной из антисмысловых последовательностей, перечисленных в одной из таблиц 1-4, и необязательно предусматривает нацеливающий лиганд.

2. Средство на основе dsRNA по п. 1, где область комплементарности РНК-транскрипту AGT содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 смежных нуклеотидов, которые отличаются не более чем 3 нуклеотидами от одной из антисмысловых последовательностей, перечисленных в одной из таблиц 1-4.

3. Средство на основе dsRNA по п. 1 или п. 2, где антисмысловая нить dsRNA по меньшей мере по сути комплементарна любой области-мишени в SEQ ID NO: 519 и представлена в любой из таблиц 1-4.

4. Средство на основе dsRNA по п. 3, где антисмысловая нить dsRNA полностью комплементарна любой области-мишени в SEQ ID NO: 519 и представлена в любой из таблиц 1-4.

5. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность смысловой нити, описанную в любой из таблиц 1-4, где последовательность смысловой нити по меньшей мере по сути комплементарна последовательности антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA.

6. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность смысловой нити, описанную в любой из таблиц 1-4, при этом последовательность смысловой нити полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA.

7. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность антисмысловой нити, указанную в любой из таблиц 1-4.

8. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность, указанную в качестве последовательности дуплекса в любой из таблиц 1-4.

9. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

10. Средство на основе dsRNA по п. 1, где все или по сути все нуклеотиды в антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами.

11. Средство на основе dsRNA по п. 5 или п. 6, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает: 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'3'-секонуклеотидные миметики, замкнутые нуклеотиды, нуклеотиды типа "незамкнутой нуклеиновой кислоты" (UNA), нуклеотиды

типа "гликолевой нуклеиновой кислоты" (GNA), 2'-F-арабинонуклеотиды, 2'-метоксиэтилнуклеотиды, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, рибитол, инвертированные нуклеотиды, инвертированные нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, инвертированные 2'-ОМе-нуклеотиды, инвертированные 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-аминомодифицированные нуклеотиды, 2'-алкилмодифицированные нуклеотиды, морфолинонуклеотиды и 3'-ОМе-нуклеотиды, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, или концевые нуклеотиды, соединенные с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-аминомодифицированные нуклеотиды, фосфорамидаты или нуклеотид, содержащий неприродное основание.

12. Средство на основе dsRNA по п. 9 или п. 10, где E-винилфосфонатнуклеотид содержится на 5'-конце направляющей нити.

13. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

14. Средство на основе dsRNA по п. 1, где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

15. Средство на основе dsRNA по п. 1, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

16. Средство на основе dsRNA по п. 1, где смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей.

17. Средство на основе dsRNA по п. 1, где антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей.

18. Средство на основе dsRNA по п. 1, где все или по сути все нуклеотиды смысловой и антисмысловой нитей являются модифицированными нуклеотидами.

19. Средство на основе dsRNA по п. 1, где модифицированная смысловая нить представляет собой модифицированную последовательность смысловой нити, указанную в одной из таблиц 2-4.

20. Средство на основе dsRNA по п. 1, где модифицированная антисмысловая нить представляет собой модифицированную последовательность антисмысловой нити, указанную в одной из таблиц 2-4.

21. Средство на основе dsRNA по п. 1, где смысловая нить комплементарна или по сути комплементарна антисмысловой нити, и длина области комплементарности составляет от 16 до 23 нуклеотидов.

22. Средство на основе dsRNA по п. 21, где длина области комплементарности составляет от 19 до 21 нуклеотида.

23. Средство на основе dsRNA по п. 1, где длина каждой нити составляет не более 30 нуклеотидов.

24. Средство на основе dsRNA по п. 1, где длина каждой нити составляет не более 25 нуклеотидов.

25. Средство на основе dsRNA по п. 1, где длина каждой нити составляет не более

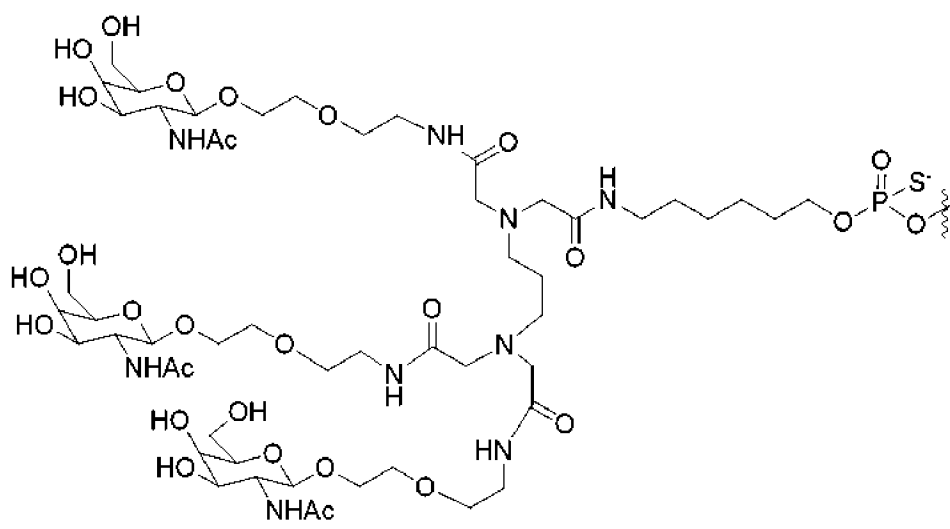
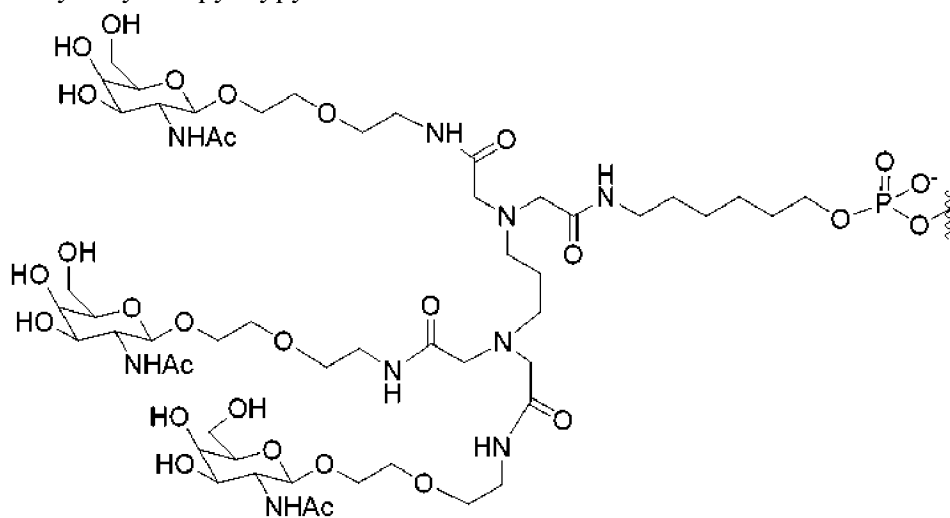
23 нуклеотидов.

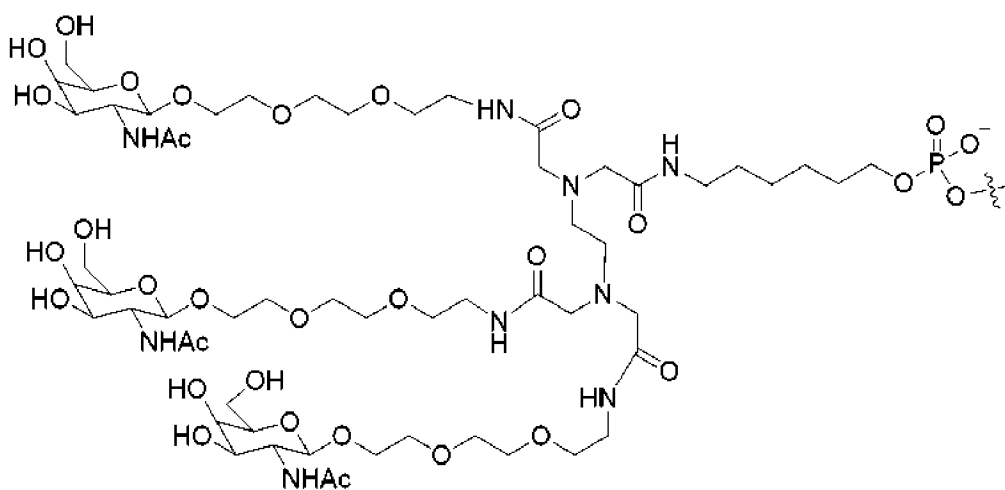
26. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и дополнительно содержит одну или несколько нацеливающих групп или связывающих групп.

27. Средство на основе dsRNA по п. 26, где одна или несколько нацеливающих групп или связывающих групп конъюгированы со смысловой нитью.

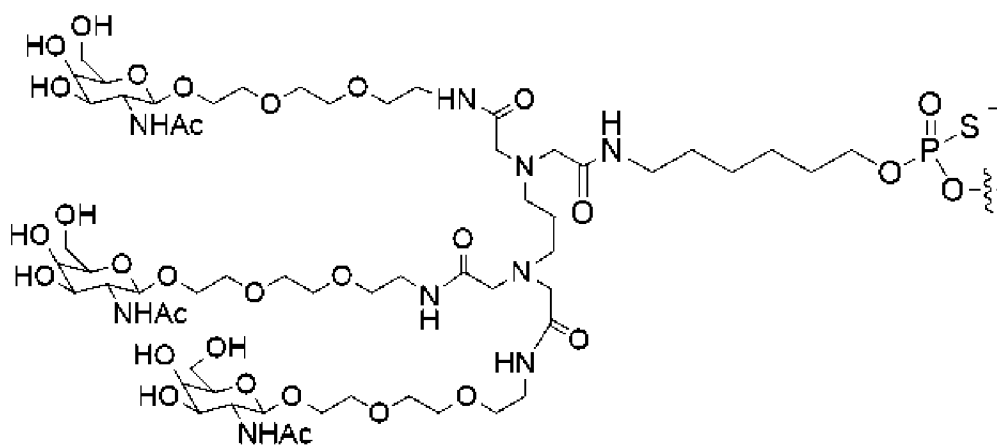
28. Средство на основе dsRNA по п. 26 или п. 27, где нацеливающая(нацеливающие) группа(группы) или связывающая(связывающие) группа(группы) содержит(содержат) N-ацетилгалактозамин (GalNAc).

29. Средство на основе dsRNA по п. 26 или п. 27, где каждая нацеливающая группа имеет следующую структуру:

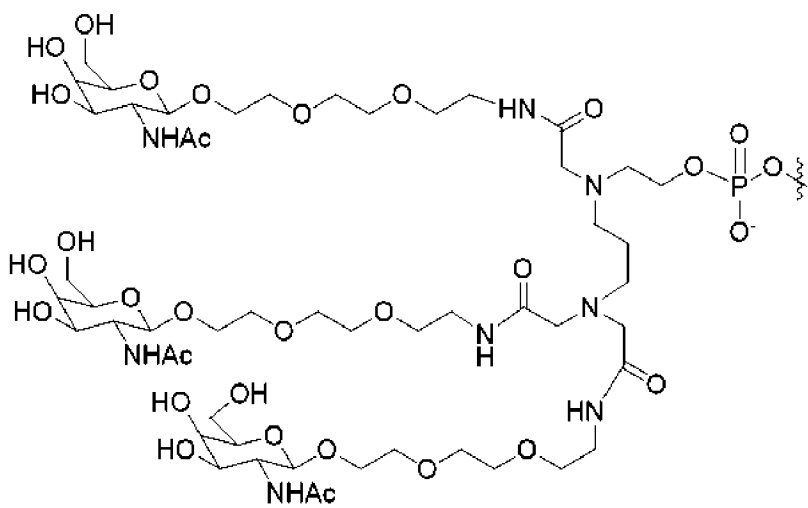




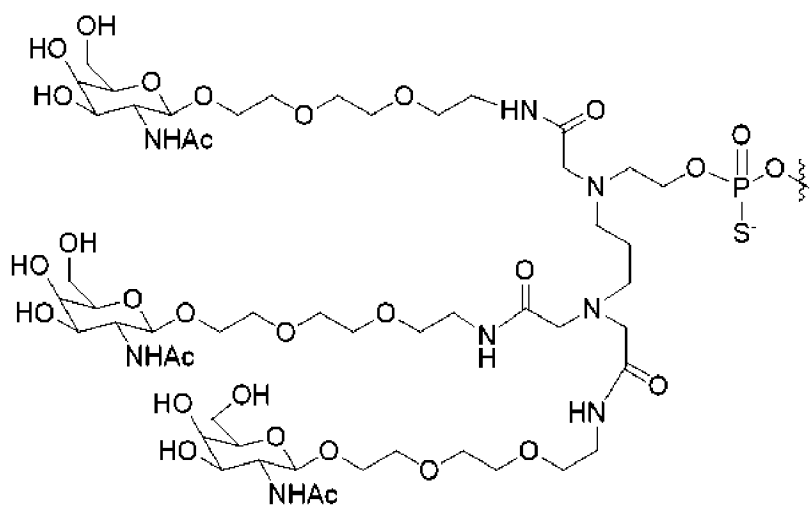
GLO-2,



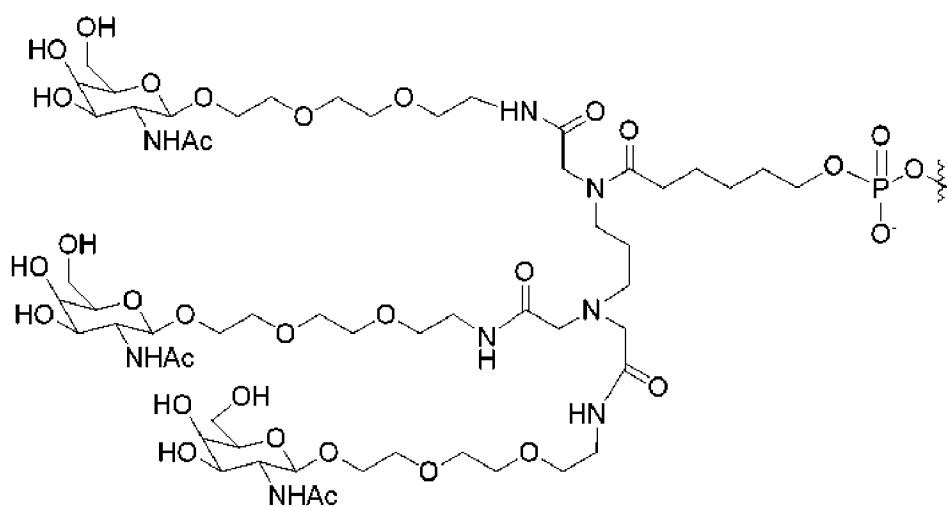
GLS-2,



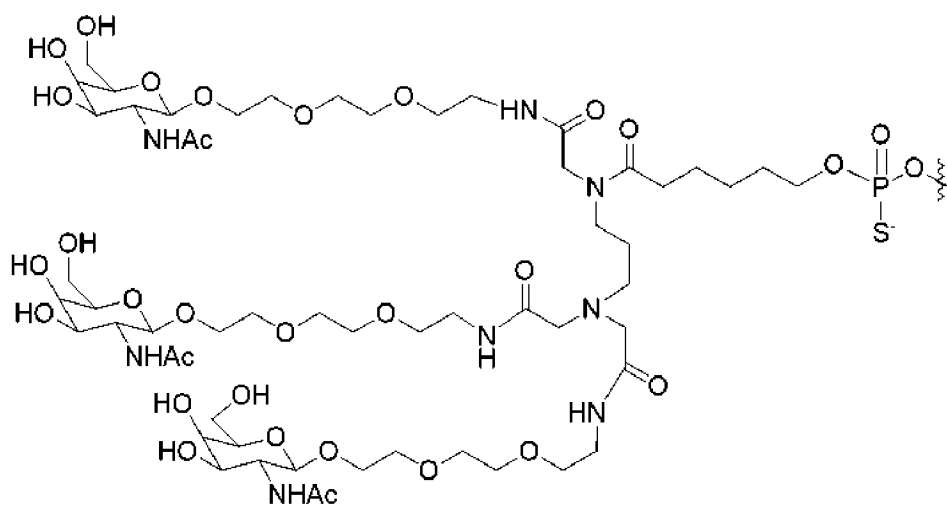
GLO-3,



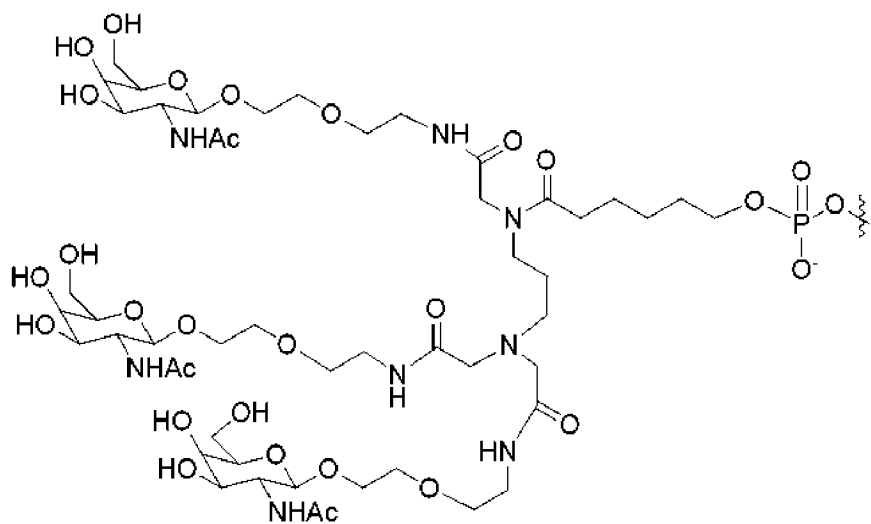
GLS-3,



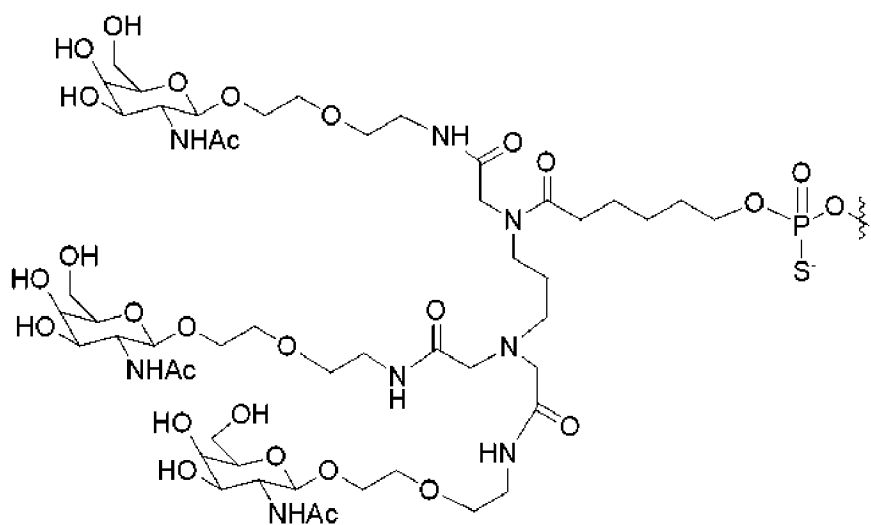
GLO-4,



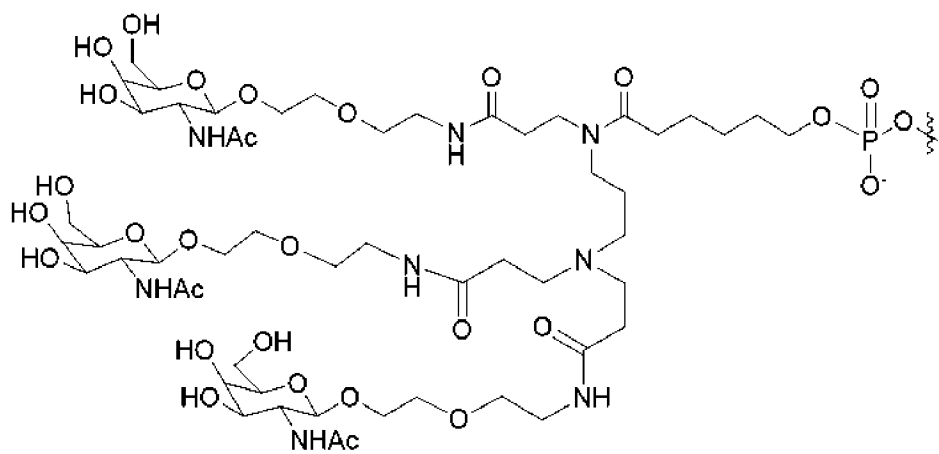
GLS-4,



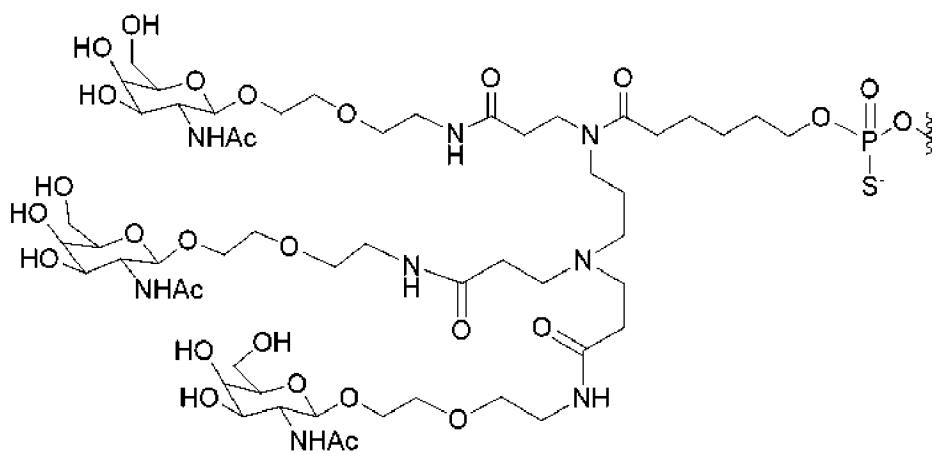
GLO-5,



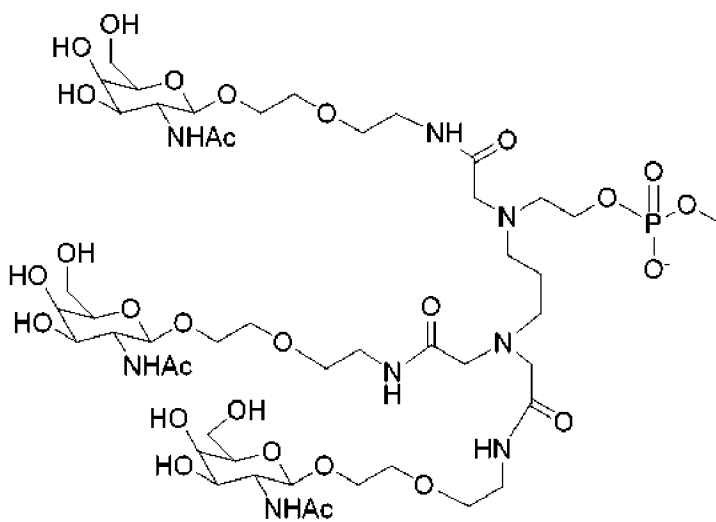
GLS-5,



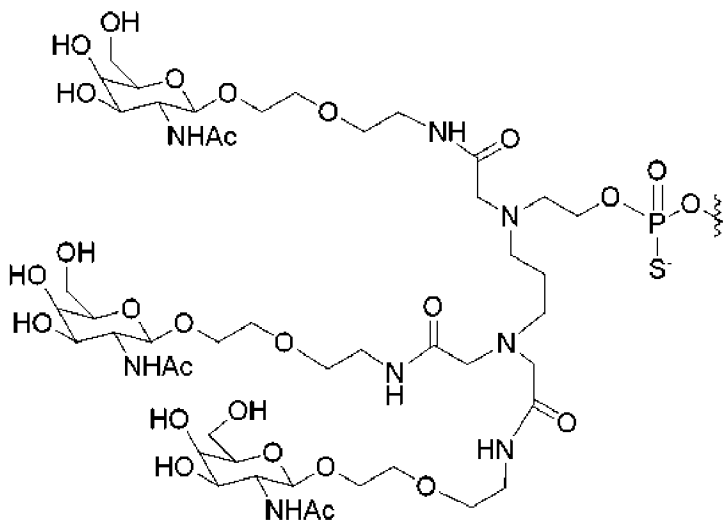
GLO-6,



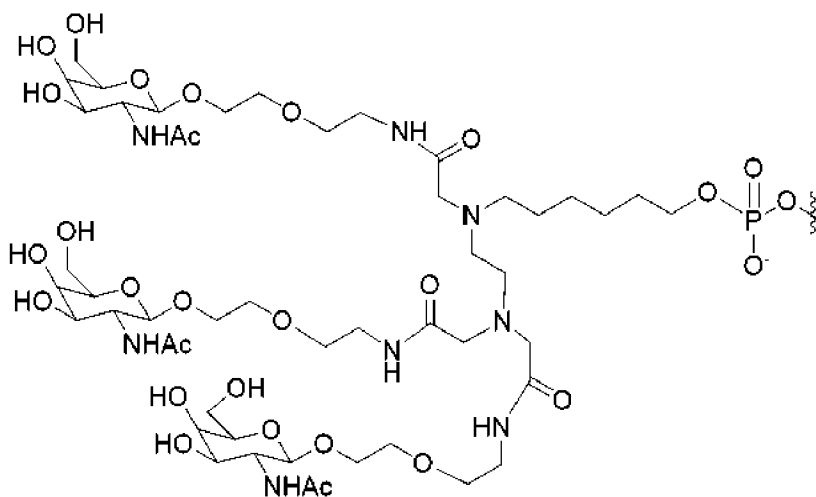
GLS-6,



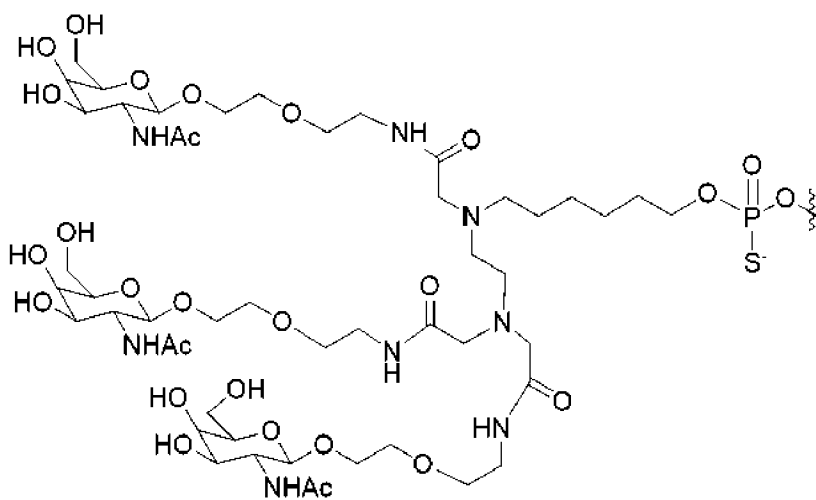
GLO-7,



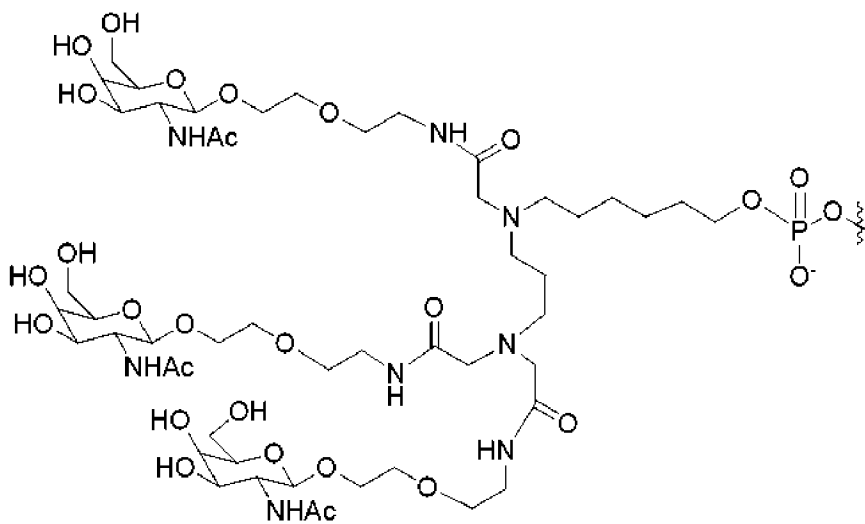
GLS-7,



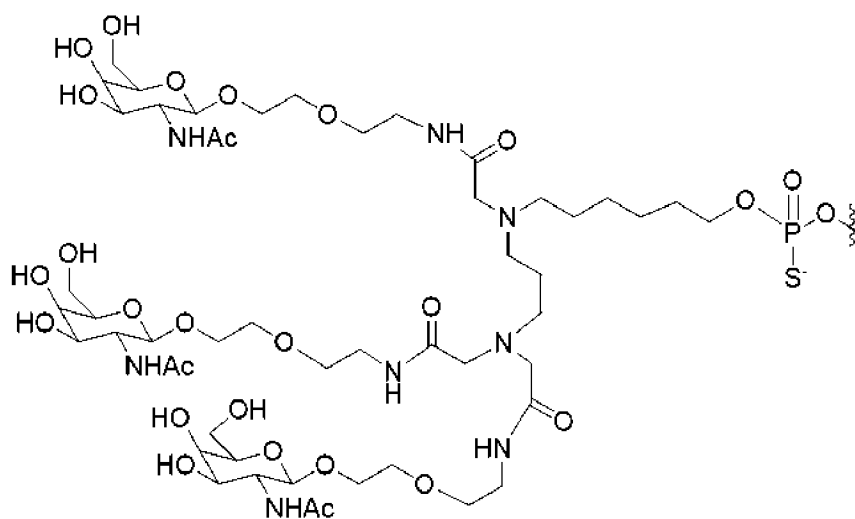
GLO-8,



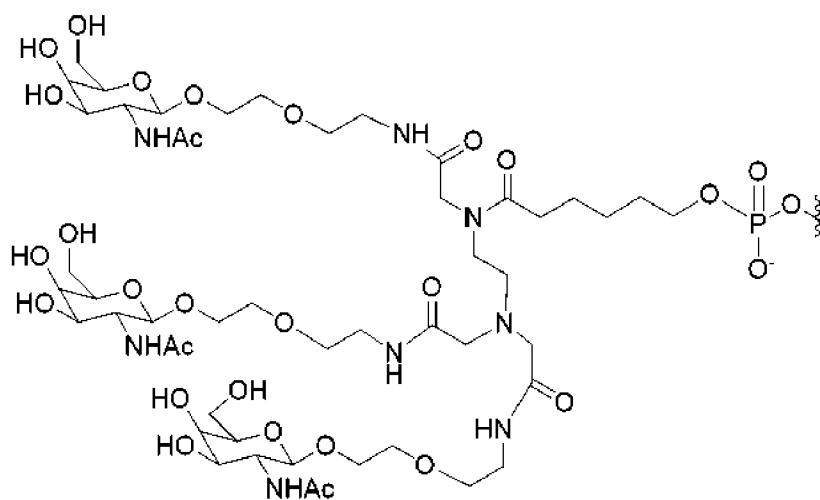
GLS-8,



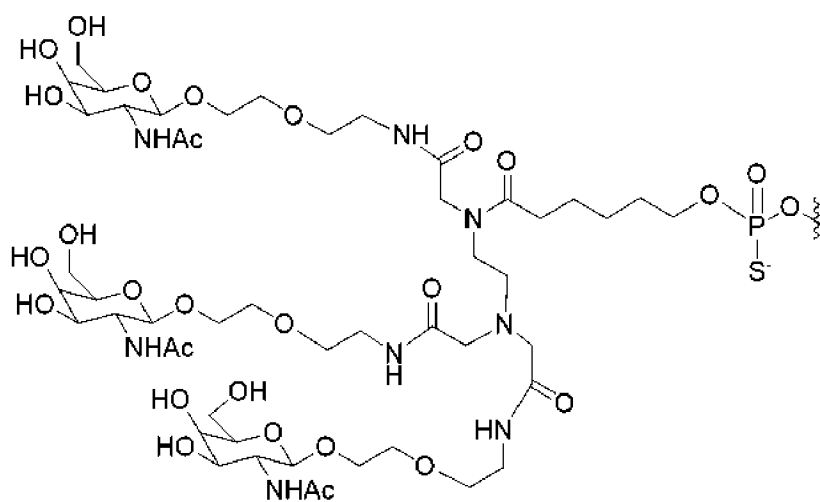
GLO-9,



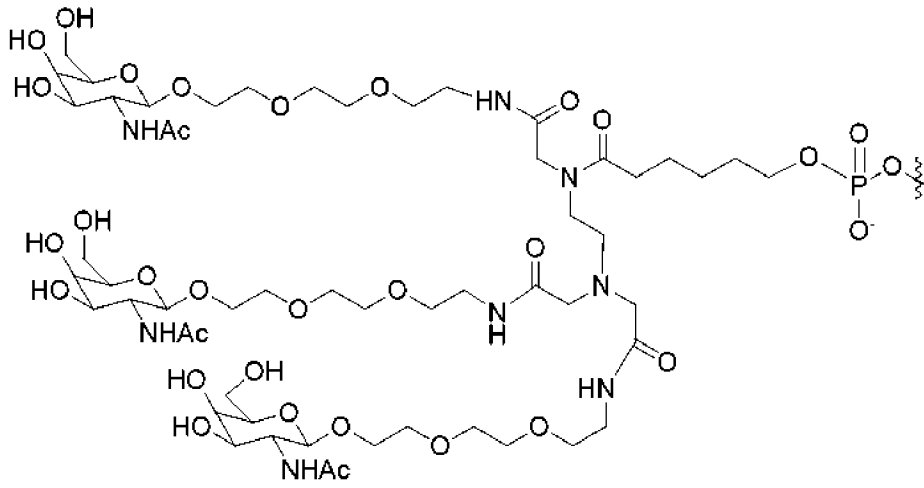
GLS-9,



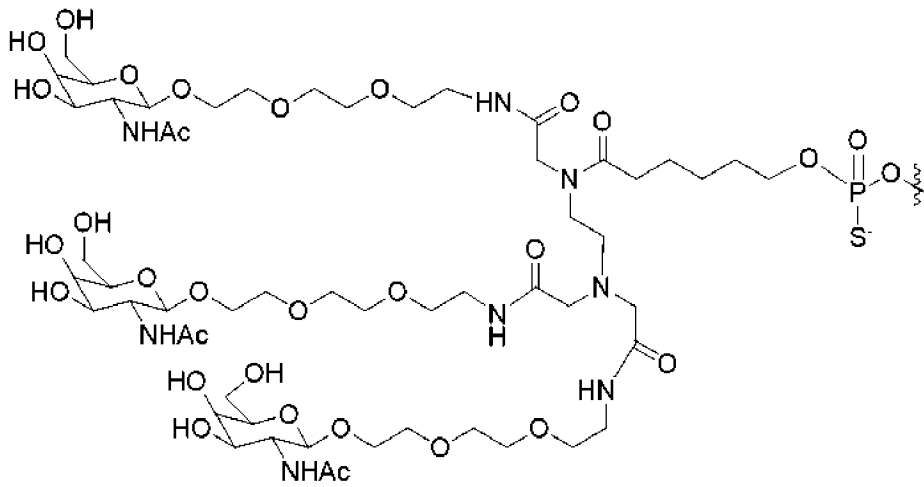
GLO-10,



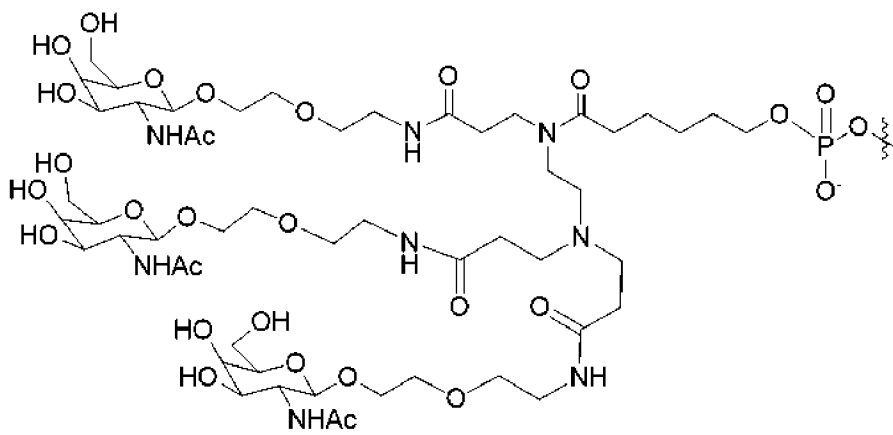
GLS-10,



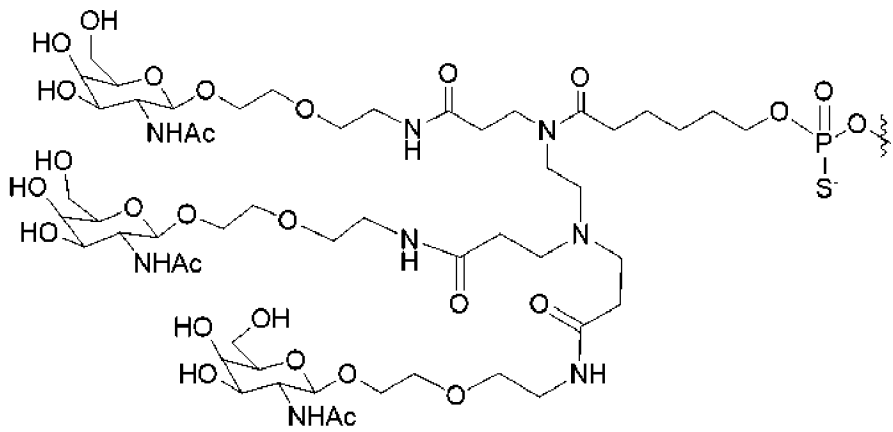
GLO-11,



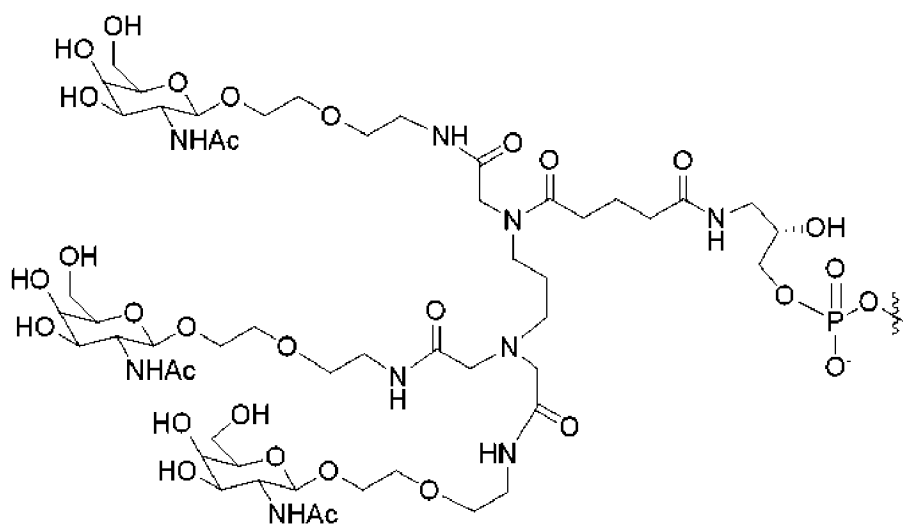
GLS-11,



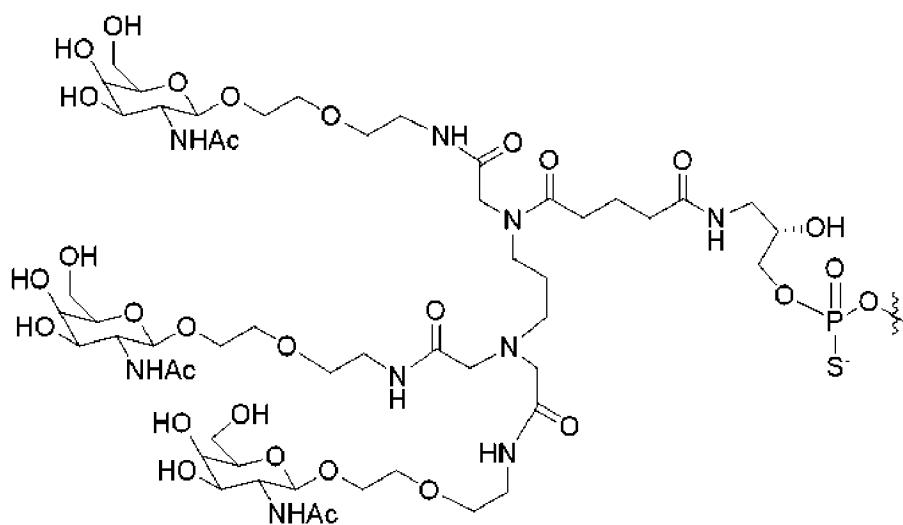
GLO-12,



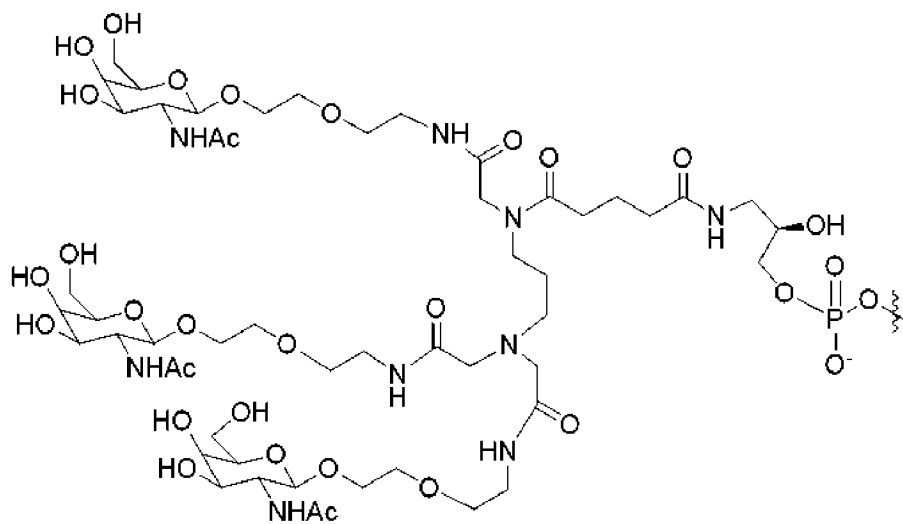
GLS-12,



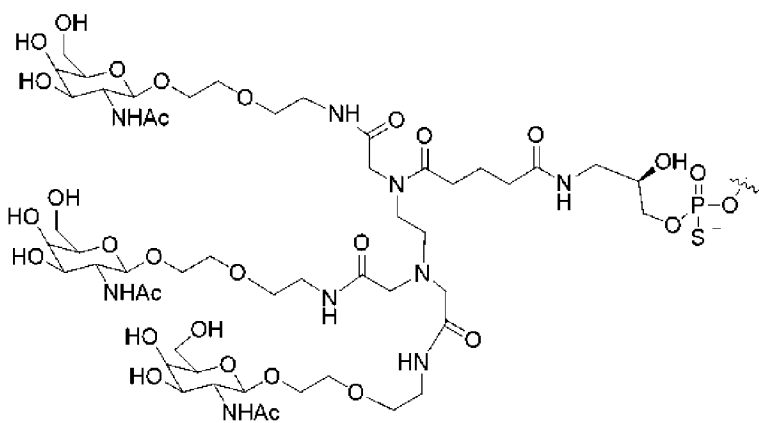
GLO-13,



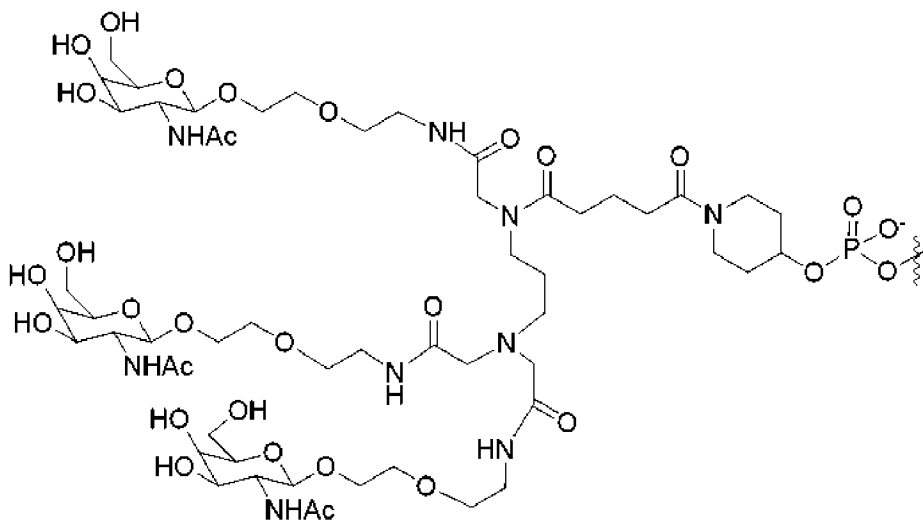
GLS-13,



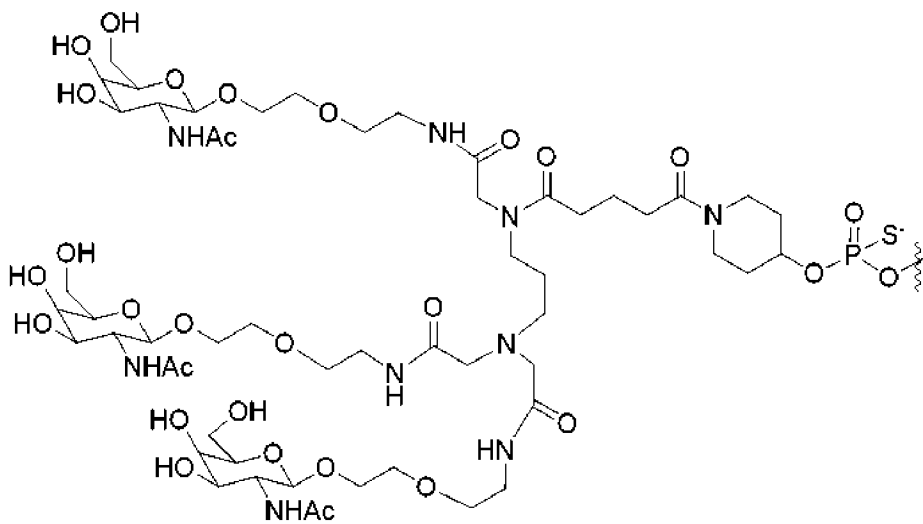
GLO-14,



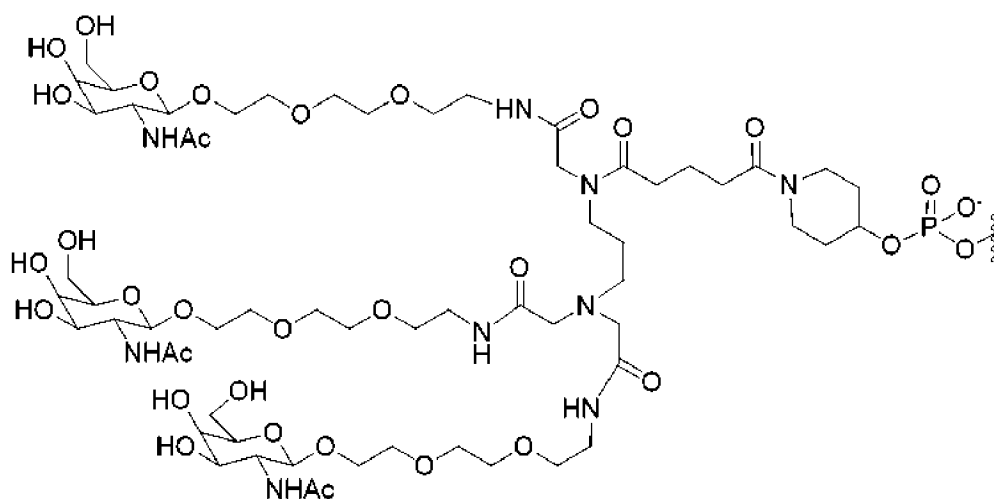
GLS-14,



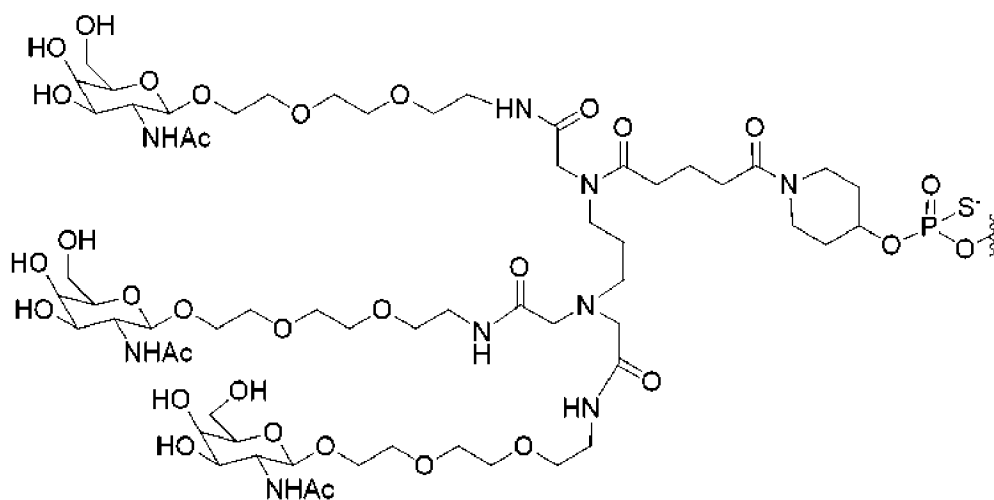
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16,



GLS-16.

30. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит нацеливающую группу, конъюгированную с 5'-концом смысловой нити.

31. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит нацеливающую группу, конъюгированную с 3'-концом смысловой нити.

32. Средство на основе dsRNA по п. 1, где антисмысловая нить содержит инвертированный остаток с удаленным азотистым основанием на 3'-конце.

33. Средство на основе dsRNA по п. 1, где смысловая нить содержит один или два инвертированных остатка с удаленными азотистыми основаниями на 3'- и/или 5'-концах.

34. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA имеет два тупых конца.

35. Средство на основе dsRNA по п. 1, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-липкий конец, состоящий из по меньшей мере 1 нуклеотида.

36. Средство на основе dsRNA по п. 1, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-липкий конец, состоящий из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

37. Композиция, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-36.

38. Композиция по п. 37, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

39. Композиция по п. 38, дополнительно содержащая одно или несколько

дополнительных терапевтических средств.

40. Композиция по п. 39, где композиция упакована в набор, контейнер, упаковку, дозатор, предварительно заполненный шприц или флакон.

41. Композиция по п. 37, где композиция составлена для подкожного введения или составлена для внутривенного (IV) введения.

42. Клетка, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-36.

43. Клетка по п. 42, где клетка представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку человека.

44. Способ подавления экспрессии гена AGT в клетке, включающий

(i) получение клеток, содержащих эффективное количество средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41.

45. Способ по п. 44, дополнительно включающий

(ii) поддержание клеток, полученных в (i) из п. 44, в течение времени, достаточного для разрушения мРНК-транскрипта гена AGT, с обеспечением таким образом подавления экспрессии гена AGT в клетке.

46. Способ по п. 44, где клетка находится в субъекте, и средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно.

47. Способ по п. 44, где клетка находится в субъекте, и средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV введения.

48. Способ по п. 46 или п. 47, дополнительно включающий оценку подавления гена AGT после введения субъекту средства на основе dsRNA, где средства оценки включают:

(i) определение у субъекта одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, и

(ii) сравнение определенной(определенных) физиологической(физиологических) характеристики(характеристик) с физиологической характеристикой(характеристиками) заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, на исходном уровне до лечения и/или контрольной физиологической характеристикой(характеристиками) заболевания или состояния, ассоциированных с AGT,

где в результате сравнения определяют одно или несколько из наличия или отсутствия подавления экспрессии гена AGT у субъекта.

49. Способ по п. 48, где определяемая физиологическая характеристика представляет собой гипертензию, которая включает первичную гипертензию, вторичную гипертензию, гипертонические кризы (такие как злокачественная гипертензия и прогрессирующая гипертензия), острую гипертензию, гипертензию беременных и резистентную гипертензию.

50. Способ по п. 49, где снижение артериального давления у субъекта указывает на снижение экспрессии гена AGT у субъекта.

51. Способ подавления экспрессии гена AGT у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из

пп. 37-41.

52. Способ по п. 51, где средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно.

53. Способ по п. 51, где средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV введения.

54. Способ по любому из пп. 51-53, дополнительно включающий оценку подавления гена AGT после введения субъекту средства на основе dsRNA, где средства оценки включают:

(i) определение у субъекта одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, и

(ii) сравнение определенной(определенных) физиологической(физиологических) характеристики(характеристик) с физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, на исходном уровне до лечения и/или контрольной физиологической характеристикой заболевания или состояния, ассоциированных с AGT,

где в результате сравнения определяют одно или несколько из наличия или отсутствия подавления экспрессии гена AGT у субъекта.

55. Способ по п. 54, где определяемая физиологическая характеристика представляет собой гипертензию, которая включает первичную гипертензию, вторичную гипертензию, гипертонические кризы (такие как злокачественная гипертензия и прогрессирующая гипертензия), острую гипертензию, гипертензию беременных и резистентную гипертензию.

56. Способ по п. 55, где снижение артериального давления у субъекта указывает на снижение экспрессии гена AGT у субъекта.

57. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированных с белком AGT, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41 с целью подавления экспрессии гена AGT.

58. Способ по п. 57, где заболевание или состояние обусловлены активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS) или ассоциированы с таковой или их симптомы или прогрессирование являются ответом на активацию RAAS, при этом указанное заболевание или состояние обычно ассоциированы с гипертензией, включая без ограничения одно или несколько из следующего: гипертоническая болезнь, гипертензия, пограничная гипертензия, первичная гипертензия, вторичная гипертензия, изолированная гипертензия, систолическая или диастолическая гипертензия, гипертензия беременных, диабетическая гипертензия, резистентная гипертензия, рефрактерная гипертензия, пароксизмальная гипертензия, реноваскулярная гипертензия, гипертензия Голдблатта, внутриглазная гипертензия, глаукома, легочная гипертензия, портальная гипертензия, системная венозная гипертензия, систолическая гипертензия, нестабильная гипертензия, гипертоническая болезнь сердца, гипертоническая нефропатия, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатия, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, хроническая сердечная недостаточность, кардиомиопатия, диабетическая кардиомиопатия,

гломерулосклероз, аортальный стеноз, аневризма аорты, фиброз желудочков, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, стенокардия, инсульт, заболевание почек, почечная недостаточность, системный склероз, внутриутробная задержка развития (IUGR) и задержка развития плода.

59. Способ по п. 57, дополнительно включающий введение субъекту дополнительной схемы лечения.

60. Способ по п. 59, где дополнительная схема лечения предусматривает введение субъекту одного или нескольких AGT-специфических антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению, введение субъекту терапевтического средства, отличного от AGT-специфической dsRNA, и модификацию образа жизни субъекта.

61. Способ по п. 60, где терапевтическое средство, отличное от AGT-специфической dsRNA, представляет собой одно или несколько из следующего: дополнительные терапевтические средства, такие как диуретики, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ACE), антагонисты рецепторов ангиотензина II, бета-блокаторы, вазодилататоры, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты альдостерона, альфа-2-агонисты, ингибиторы ренина, альфа-блокаторы, периферически действующие адренергические средства, селективные частичные агонисты рецептора D1, неселективные альфа-адренергические антагонисты, синтетические стероидные антиминокортикоиды или комбинации любых из вышеперечисленных средств, а также терапевтические средства от гипертензии в виде комбинаций средств.

62. Способ по п. 57, где средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно.

63. Способ по п. 57, где средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV введения.

64. Способ по любому из пп. 57-63, дополнительно включающий определение эффективности введенного субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA).

65. Способ по п. 64, где средства для определения эффективности лечения субъекта включают:

(i) определение одной или нескольких физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта, и

(ii) сравнение определенной(определенных) физиологической(физиологических) характеристики(характеристик) с физиологической характеристикой(характеристиками) заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, на исходном уровне до лечения,

где в результате сравнения определяют одно или несколько из наличия, отсутствия и уровня эффективности средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), введенного субъекту.

66. Способ по п. 65, где определяемая физиологическая характеристика представляет собой гипертензию, которая включает первичную гипертензию, вторичную гипертензию, гипертонические кризы (такие как злокачественная гипертензия и прогрессирующая гипертензия), острую гипертензию, гипертензию беременных и

резистентную гипертензию.

67. Способ по п. 65, где снижение артериального давления у субъекта указывает на наличие эффективности введения субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA).

68. Способ снижения уровня белка AGT у субъекта по сравнению с уровнем белка AGT у субъекта на исходном уровне до лечения, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41 для снижения уровня экспрессии гена AGT.

69. Способ по п. 68, где средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или IV.

70. Способ изменения физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта по сравнению с физиологическими характеристиками заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта на исходном уровне до лечения, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41 с целью изменения физиологических характеристик заболевания или состояния, ассоциированных с AGT, у субъекта.

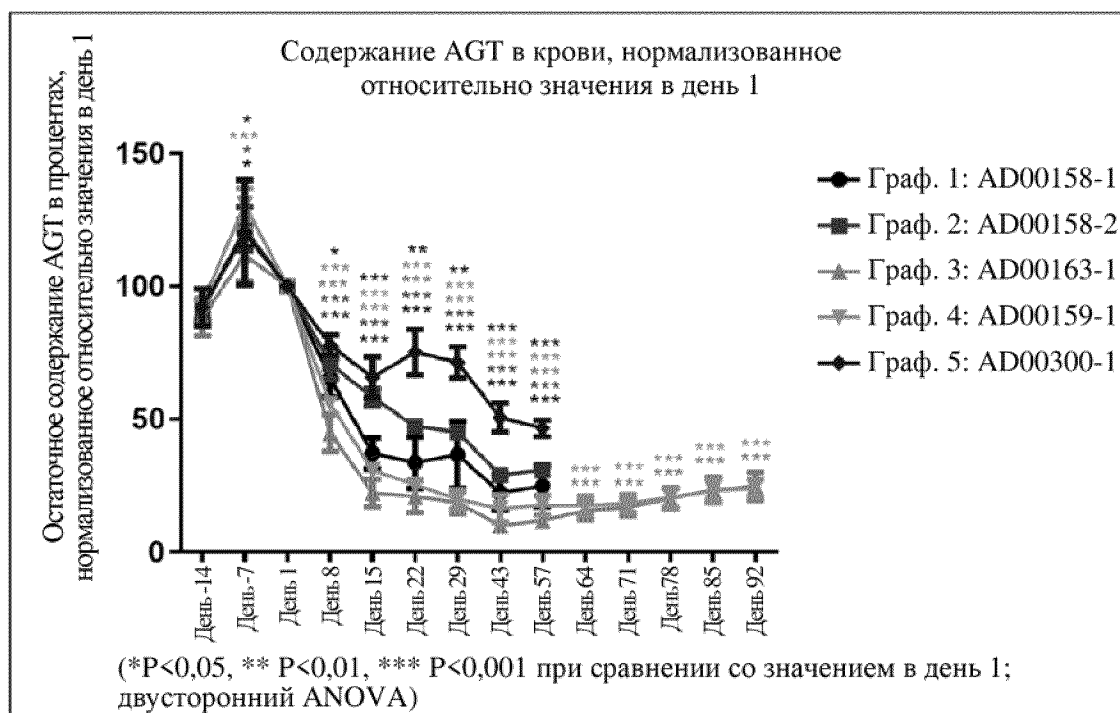
71. Способ по п. 70, где средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или IV.

72. Способ по п. 70, где физиологическая характеристика представляет собой гипертензию, которая включает первичную гипертензию, вторичную гипертензию, гипертонические кризы (такие как злокачественная гипертензия и прогрессирующая гипертензия), острую гипертензию, гипертензию беременных и резистентную гипертензию.

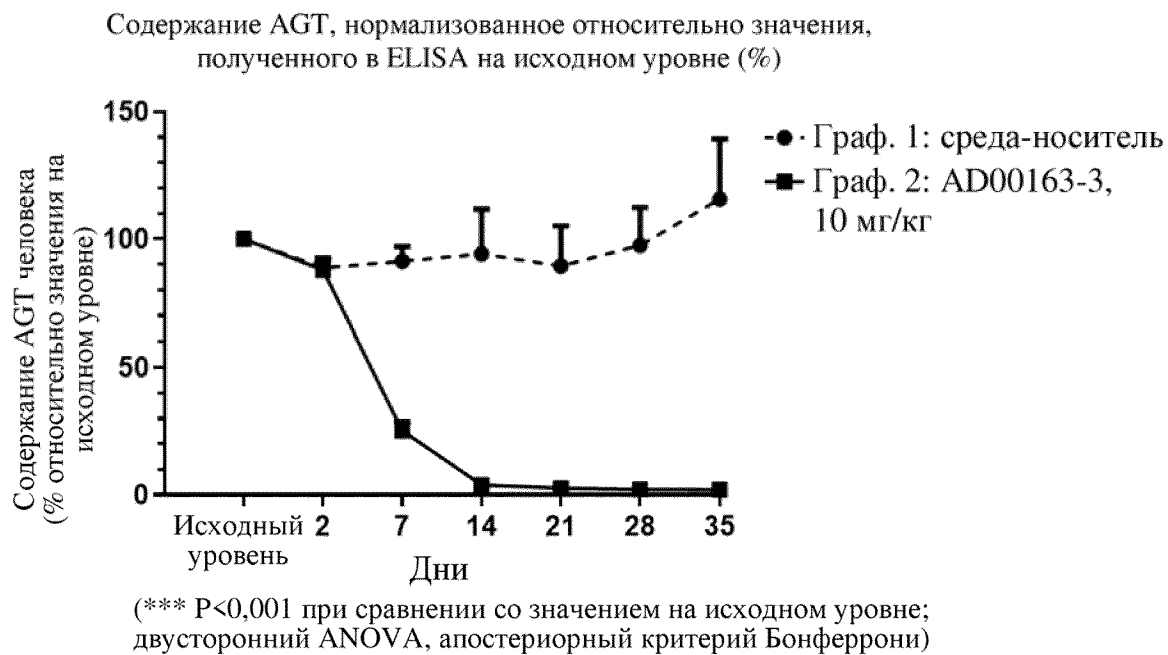
73. Средство на основе dsRNA по п. 1, содержащее смысловую нить, которая отличается от формулы (A) 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами: 5'-Z₁AGCUUGUUUGUGAAACZ₂-3' формула (A), где Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 0-15 нуклеотидов, и Z₂ выбрана из одного из A, U, C, G или отсутствует.

74. Средство на основе dsRNA по п. 1, содержащее антисмысловую нить, которая отличается от формулы (B) 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами: 5'-Z₃GUUUCACAAACAAGCUZ₄-3' формула (B), где Z₃ выбрана из одного из A, U, C, G или отсутствует, и Z₄ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую мотивы из 0-15 нуклеотидов.

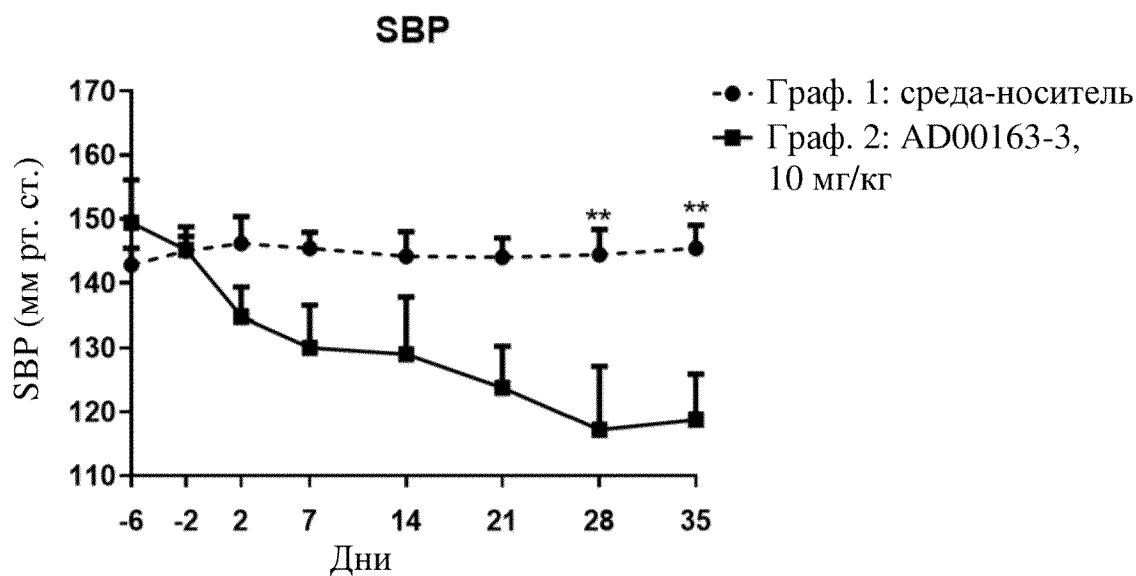
По доверенности



Фигура 1

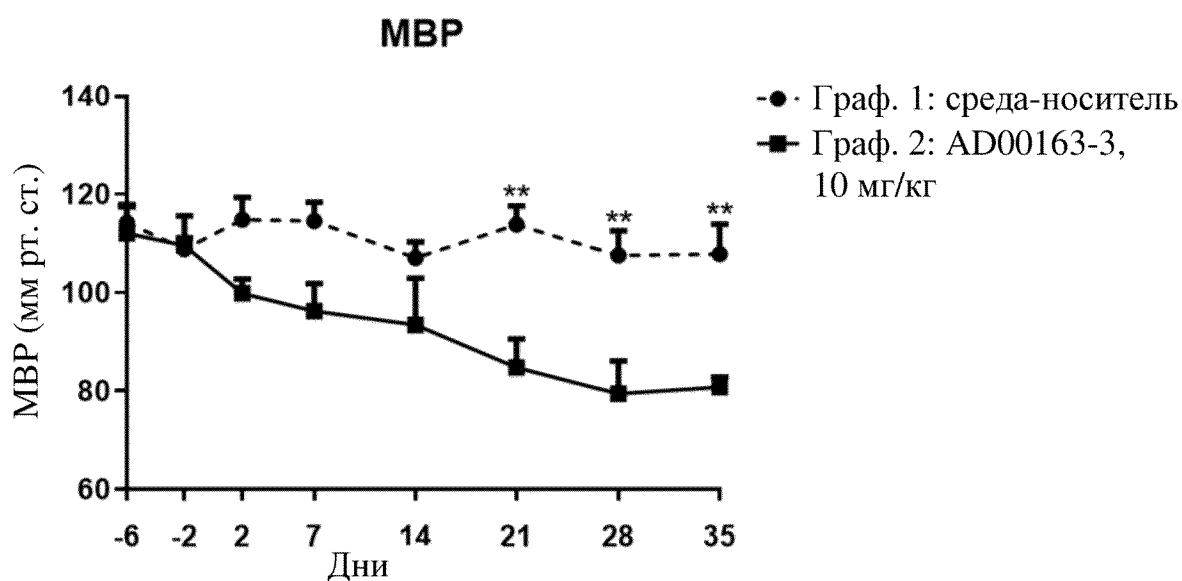


Фигура 2



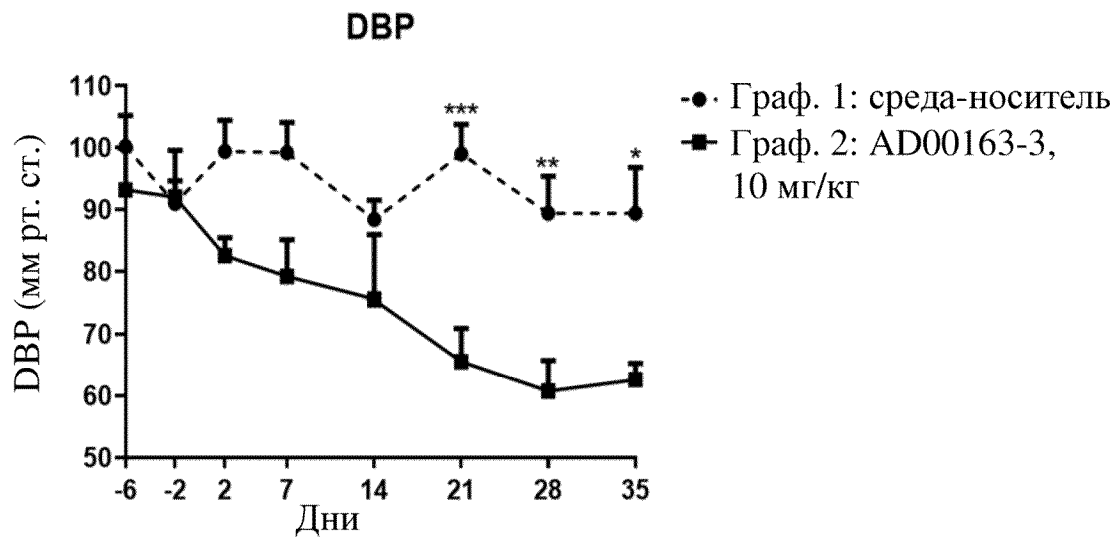
(** $P < 0,01$ при сравнении со значениями графика 1 для среды-носителя; двусторонний ANOVA, апостериорные критерии Бонферрони)

Фигура 3



(** $P < 0,01$ при сравнении со значениями графика 1 для среды-носителя; двусторонний ANOVA, апостериорные критерии Бонферрони)

Фигура 4



(* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ при сравнении со значениями графика 1 для среды-носителя; двусторонний ANOVA, апостериорные критерии Бонферрони)

Фигура 5