

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491258** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.11.12

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

(22) Дата подачи заявки
2021.09.21

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ**

(31) 63/081,633

(32) 2020.09.22

(33) US

(62) 202390909; 2021.09.21

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE); АЙОНИС
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК (US)

(72) Изобретатель:

Линден Дэниел (SE), Ли Ричард, Бый
Хюнх-Хоа (US), Ромео Стефано (SE)

(74) Представитель:

Билык А.В., Дмитриев А.В., Соколова
М.В., Путинцев А.И., Черкас
Д.А., Игнатъев А.В., Бучака С.М.,
Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения или предупреждения жировой болезни печени и/или понижения уровней холестерина и LDL-холестерина у субъекта. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы понижения уровня экспрессии белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3), у субъекта.

A1

202491258

202491258

A1

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения или предупреждения жировой болезни печени и/или понижения уровней холестерина и LDL-холестерина у субъекта. В настоящем изобретении предусмотрены способы понижения уровня экспрессии белка *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта. Также в данном документе предусмотрены соединения, подходящие для понижения уровня экспрессии PSD3.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Жировая болезнь печени (FLD) определяется как содержание липидов в печени, превышающее 5%, при наличии или отсутствии чрезмерного употребления алкоголя. Неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) встречается в каждой возрастной группе, но особенно поражает людей в возрасте от 40 до 50 лет и от 50 до 60 лет, которые подвержены высокому риску заболеваний сердца вследствие таких факторов высокого риска, как ожирение и диабет 2 типа. Жировая болезнь печени также тесно связана с метаболическим синдромом, который представляет собой группу патологических изменений, в том числе увеличение абдоминального жира, плохая способность использовать гормон инсулин, высокое кровяное давление и высокие уровни триглицеридов в крови. NAFLD становится все более распространенной во всем мире; в Соединенных Штатах это наиболее распространенная форма хронического заболевания печени и она поражает от 80 до 100 миллионов человек (клиника Мейо, неалкогольная жировая болезнь печени). Во всем мире NAFLD поражает около 25% населения мира. NAFLD предусматривает неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH). Пациенты, у которых NAFL развивается в NASH, характеризуются увеличенной общей и специфической для печени смертностью, а также увеличенными рисками цирроза, печеночной недостаточности и гепатоцеллюлярной карциномы (HCC). NASH быстро становится ведущей причиной хронических заболеваний печени и превзойдет гепатит С как ведущую причину трансплантации печени в США. Стеатоз печени у людей с NAFL характеризуется существенным накоплением капель липидов в гепатоцитах. При гистологических исследованиях биоптатов печени при прогрессировании до NASH отмечается воспаление печени и гепатоцеллюлярное повреждение с фиброзом печени или без него. Прогрессирующий фиброз приводит к неблагоприятным клиническим исходам,

связанным с печенью, и развивается у 35-41% пациентов с NASH согласно мета-анализу исследований биоптата в двух повторностях.

[0003] Существующие варианты лечения включают снижение веса и, в случае алкогольной жировой болезни печени, снижение или прекращение употребления алкоголя. В настоящее время ни один фармацевтический продукт не одобрен для лечения неалкогольной жировой болезни печени или алкогольной жировой болезни печени. Что касается механизма действия, повреждение печени, в том числе воспаление, гепатоцеллюлярное повреждение и фиброз, предусматривает сходные пути при неалкогольной жировой болезни печени и алкогольной жировой болезни печени. Поэтому вполне вероятно, что фармацевтический продукт, разработанный для лечения неалкогольной жировой болезни печени, будет также действовать при алкогольной жировой болезни печени. Кроме того, эктопическое накопление липидов, в том числе в печени, запускает пути, которые нарушают передачу сигнала с участием инсулина, что приводит к резистентности печени к инсулину, что приводит к диабету 2 типа. Таким образом, виды терапии, которые снижают уровни липидов в печени, устранят одну из основных причин диабета 2 типа (*J. Clin. Invest.* 126(1):12-22 (2016)).

[0004] При разработке современных фармацевтических продуктов для лечения жировой болезни печени могут иметь место дополнительные проблемы повышения уровней холестерина у пациентов, что создаст дополнительную нагрузку на здоровье пациентов, которые уже подвержены высокому риску развития заболеваний сердца, ожирения и диабета 2 типа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение направлено на способ лечения или предупреждения жировой болезни печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3), у субъекта.

[0006] В некоторых вариантах осуществления жировая болезнь печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH) (цирротический и нецирротический NASH), дислипидемию, смешанную дислипидемию, гиперхолестеринемию, диабет, фиброз печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), алкогольную жировую болезнь печени (AFLD) или алкогольный стеатогепатит (ASH) (цирротический и нецирротический ASH). В определенных вариантах осуществления гиперхолестеринемия представляет собой

семейную гиперхолестеринемию. В некоторых вариантах осуществления жировая болезнь печени представляет собой диабет. В некоторых вариантах осуществления жировая болезнь печени представляет собой диабет 2 типа.

[0007] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет сердечно-сосудистое заболевание. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой дислипидемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой смешанную дислипидемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой гиперхолестеринемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой семейную гиперхолестеринемию.

[0008] В некоторых вариантах осуществления способ введения соединения субъекту, нуждающемуся в этом, уменьшает одно или несколько из содержания внутриклеточного жира в печени, веса печени, содержания триглицеридов в печени, циркулирующей в плазме крови аланинаминотрансферазы (ALT), коллагена 1a1 печени и содержания липидов у субъекта.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способ снижает повреждение печени, стеатоз, фиброз печени, воспаление печени, рубцевание или цирроз печени, печеночную недостаточность у субъекта.

[0010] Некоторые варианты осуществления направлены на способ подавления экспрессии или активности PSD3 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с соединением, содержащим полинуклеотид, эффективного в отношении понижения уровня экспрессии PSD3, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии или активности PSD3 в клетке. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой гепатоцит. В определенных вариантах осуществления клетка находится в субъекте. В определенных вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску развития неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH) (цирротического и нецирротического), дислипидемии, смешанной дислипидемии, гиперхолестеринемии, диабета, фиброза печени, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), алкогольной жировой болезни печени (AFLD) или алкогольного стеатогепатита (ASH) (цирротического и нецирротического) или диабета 2 типа.

[0011] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения активации фактора ADP-рибозилирования 6 (ARF6), при этом способ включает понижение уровня экспрессии PSD3 у субъекта, включает

введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта, где более низкий уровень экспрессии PSD3 обеспечивает сниженную активацию ARF6.

[0012] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения содержания внутриклеточного жира в клетке печени у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта.

[0013] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения уровня холестерина у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта понижен LDL-холестерин.

[0014] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ идентификации субпопуляции субъектов, имеющих жировую болезнь печени, подходящую для терапии, обеспечивающей снижение уровня PSD3, при этом способ включает: (i) диагностику наличия у субъекта жировой болезни печени; (ii) определение того, имеет ли субъект аллельный вариант 186T PSD3 или аллельный вариант 186L PSD3; где, если субъект имеет аллельный вариант 186L PSD3, то подходящее лечение включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3, и при этом, если субъект имеет аллельный вариант 186T PSD3, то лечение не включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3, которое является неподходящим. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) может быть определена путем генотипирования аллельного варианта 186L или путем вывода из генотипирования генетического варианта в сильном неравновесном сцеплении с аллельным вариантом 186L.

[0015] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего жировую болезнь печени, при этом способ включает: (i) определение того, имеет ли субъект аллельный вариант 186T PSD3

или аллельный вариант 186L PSD3, и (ii) введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3, только если субъект имеет аллельный вариант 186L PSD3. В некоторых вариантах осуществления стадия (i) может быть определена путем генотипирования аллельного варианта 186L или путем вывода из генотипирования генетического варианта в сильном неравновесном сцеплении с аллельным вариантом 186L. В некоторых вариантах осуществления у субъекта отсутствует аллельный вариант 186T PSD3. В любом из предыдущих вариантов осуществления субъект представляет собой человека.

[0016] В некоторых вариантах осуществления соединение выбрано из антисмыслового олигонуклеотида (ASO), siRNA или ssRNAi. В некоторых вариантах осуществления соединение содержит полинуклеотид, который является комплементарным по отношению к участку равной длины любой из последовательностей под SEQ ID NO: 2-18. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является одонитевым. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид спарен со вторым полинуклеотидом с образованием дуплекса. В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой соединение на основе siRNA.

[0017] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 8-50 связанных нуклеозидов и содержит последовательность нуклеиновых оснований, характеризующуюся по меньшей мере 90% комплементарностью по отношению к участку равной длины нуклеиновой кислоты, кодирующей PSD3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 12-30 связанных нуклеозидов в длину.

[0018] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований, характеризующуюся по меньшей мере 90% комплементарностью по отношению к участку равной длины всех или одной из последовательностей под SEQ ID NO: 2-18.

[0019] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере одну модификацию, выбранную из по меньшей мере одной модифицированной межнуклеозидной связи, по меньшей мере одного модифицированного сахарного фрагмента и по меньшей мере одного модифицированного нуклеинового основания.

[0020] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из нуклеозидов полинуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В

определенных вариантах осуществления модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар или 2'-О-метоксиэтил. В определенных вариантах осуществления модифицированный сахар содержит мостик 4'-СН(СН₃)-О-2' или мостик 4'-(СН₂)_n-О-2', где n равен 1 или 2.

[0021] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из нуклеозидов полинуклеотида содержит модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин.

[0022] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна межнуклеозидная связь полинуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

[0023] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления антисмысловый олигонуклеотид содержит:

гэп-сегмент, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

где гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, непосредственно примыкая к ним, и при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар.

[0024] В некоторых вариантах осуществления соединение содержит конъюгированную группу. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа присоединена к 5'-концу или 3'-концу полинуклеотида. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа содержит от одного до пяти фрагментов GalNAc. В некоторых вариантах осуществления соединение доставляют в клетку печени субъекта.

[0025] В определенных вариантах осуществления соединение вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах осуществления способ включает совместное введение соединения и по меньшей мере одного дополнительного средства терапии.

[0026] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено соединение, содержащее полинуклеотид, состоящий из 8-50 связанных нуклеозидов и содержащий последовательность нуклеиновых оснований, характеризующуюся по меньшей мере 90% комплементарностью последовательности по отношению к участку равной длины последовательности под SEQ ID NO: 2-18.

[0027] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 12-20 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 16 связанных нуклеозидов.

[0028] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из нуклеозидов полинуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар или 2'-О-метоксиэтил. В определенных вариантах осуществления модифицированный сахар содержит мостик 4'-CH(CH₃)-O-2' или мостик 4'-(CH₂)_n-O-2', где n равен 1 или 2.

[0029] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из нуклеозидов полинуклеотида содержит модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин.

[0030] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из межнуклеозидных связей полинуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

[0031] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит:

гэп-сегмент, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов;

где гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, непосредственно примыкая к ним, и при этом

каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар.

[0032] В определенных вариантах осуществления соединение содержит от одного до пяти фрагментов GalNAc. В определенных вариантах осуществления фрагменты GalNAc присоединены к 5'-концу или 3'-концу полинуклеотида.

[0033] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на антисмысловой олигонуклеотид, где последовательность нуклеиновых оснований антисмыслового олигонуклеотида представляет собой последовательность под SEQ ID NO: 1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] На **фиг. 1** показана таблица 32 локусов, влияющих на триглицериды у индивидуумов европейского происхождения (Teslovich et al., Nature 466, 707-713, 2010), как описано в примере 1. Сокращения: TG, триглицериды; TC, общий холестерин; LDL, липопротеины низкой плотности; HDL, липопротеины высокой плотности.

[0035] На **фиг. 2** показана таблица миссенс-вариантов, ассоциированных с содержанием триглицеридов в печени, в исследовании сердца в Далласе, как описано в примере 1. Из 32 локусов, идентифицированных в предыдущем полногеномном исследовании уровней циркулирующих триглицеридов, в общей сложности 3 миссенс-варианта с MAF у европейцев > 5% были номинально ассоциированы с содержанием триглицеридов в печени в когорте DHS. Из этих вариантов один был ассоциирован с уменьшением содержания жира в печени (rs71519934, бета = -0,02), и 2 были ассоциированы с увеличением содержания жира в печени (rs1260326, бета = 0,03 и rs58542926, бета = 0,12). Ассоциацию тестировали с помощью линейного регрессионного анализа, скорректированного с учетом возраста, пола и четырех основных компонентов происхождения. Сокращения: Chr, хромосома; rsID, идентификация эталонного однонуклеотидного полиморфизма; N0, число индивидуумов, гомозиготных по мажорному аллелю; N1, число гетерозиготных индивидуумов; N2, число индивидуумов, гомозиготных по минорному аллелю; MAF, частота минорного аллеля. \wedge MAF относится к частоте минорного аллеля в общей когорте DHS. В DHS rs71519934 был обнаружен как rs7003060, который находится в полном неравновесном сцеплении ($D' = 1, r^2 = 1$) с rs71519934. $\wedge\wedge$ MAF EUR относится к данным проекта 1000 Genome, представленным в базе данных однонуклеотидных полиморфизмов (dbSNP, текущая сборка 154, выпущенная 21 апреля 2020 г.), за

исключением rs71519934, частота которого была оценена у британских участников европеоидного происхождения на основании данных секвенирования 50000 экзотов из Британского биобанка по причине отсутствия доступа в dbSNP. *Генотип GCKR не был определен у двух индивидуумов.

[0036] На **фиг. 3** показаны непрерывные и категориальные признаки когорты биопсии печени (LBC) и независимой репликативной когорты ЕС ("центральноевропейская когорта"). Непрерывные признаки показаны как среднее значение и стандартное отклонение (нормально распределенные признаки) или медиана и квартильный диапазон (ненормально распределенные признаки). Категориальные признаки показаны в виде чисел и пропорций. *данные доступны для $n = 1805$.

[0037] На **фиг. 4** показана таблица ассоциации минорного аллеля PSD3 rs71519934 с более низкой распространенностью заболевания печени в когорте биопсии печени (LBC, N гистологических данных = 1951), измеренной по более низкой распространенности стеатоза, фиброза, воспаления и баллонирования печени с применением бинарного логистического регрессионного анализа в рамках аддитивной генетической модели, с учетом возраста, полу, BMI, центру набора и числу мутантного аллеля PNPLA3. Наличие стеатоза, фиброза, воспаления или баллонирования определяли как относительную степень > 0 . *данные доступны для $n = 1805$.

[0038] На **фиг. 5A - C** показано, что минорный аллель PSD3 обеспечивает защиту от повышенной тяжести повреждения печени на гистологическом уровне в когорте биопсии печени (LBC) и экспрессия его гена является более высокой в печени с FLD. На **фиг. 5A** проиллюстрировано повреждение печени на гистологическом уровне, стратифицированное по генотипу PSD3 в когорте биопсии печени (LBC). Столбики показывают степень указанного заболевания, и переход цвета от белого к черному указывает на повышенную тяжесть заболевания. Повреждение на гистологическом уровне оценивали в соответствии с различными компонентами показателя активности FLD (NAS) и стадией фиброза печени. У носителей минорного аллеля PSD3 rs71519934 186T заболевание печени было менее тяжелым с меньшей степенью стеатоза, воспаления, баллонирования и фиброза. Ассоциацию тестировали с помощью порядкового регрессионного анализа, скорректированного с учетом возраста, пола, BMI, центра набора и числа мутантных аллелей PNPLA3 I148M.

[0039] На **фиг. 5B** показана общая экспрессия мРНК PSD3, стратифицированная по здоровой печени и печени с FLD. Уровни экспрессии PSD3 в печени были выше у

субъектов с FLD по сравнению со здоровыми контролями. P-значения рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. На **фиг. 5C** показана экспрессия общей мРНК NAT2, стратифицированная по здоровой печени и печени с FLD. Не было различий в уровне экспрессии NAT2 в зависимости от наличия FLD. P-значения рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Сокращения: Ctr, здоровые контрольные печени (n = 10); FLD, печени с жировой болезнью печени (n = 67); PSD3, белок 3, содержащий домен плекстрина и Sec7; NAT2, N-ацетилтрансфераза 2.

[0040] На **фиг. 6** показано, что минорный аллель PSD3 rs71519934 ассоциируется с меньшей распространенностью и меньшей тяжестью заболевания печени в независимой репликативной когорте ЕС (N гистологических данных = 674). Ассоциацию тестировали с помощью бинарного логистического (наличие заболевания) или порядкового регрессионного анализа (тяжесть заболевания) в рамках аддитивной генетической модели, с учетом возраста, полу, BMI, центра набора и количеству мутантного аллеля PNPLA3. Соотношение шансов (OR) для порядковой регрессии рассчитывали как экспоненты оценки коэффициента и его доверительного интервала (CI). Наличие стеатоза, фиброза, воспаления или баллонирования определяли как относительную степень > 0.

[0041] На **фиг. 7** показаны непрерывные и категориальные признаки когорты биопсии печени (LBC) и репликативной когорты из независимой репликативной когорты ЕС ("центральноевропейская когорта"), стратифицированной по PSD3 rs71519934. Непрерывные признаки показаны как среднее значение и стандартное отклонение (нормально распределенные признаки) или медиана и квартильный диапазон (ненормально распределенные признаки). Категориальные признаки показаны в виде чисел и пропорций. Для непрерывных признаков P-значения были рассчитаны с помощью линейной регрессии в рамках аддитивной генетической модели, не скорректированной (с учетом возраста) или скорректированной с учетом возраста, пола и центра набора (BMI) или с учетом возраста, пола, BMI и центра набора. Ненормально распределенные признаки перед вводом в модель подвергали логарифмическому преобразованию. Для категориальных признаков P-значения рассчитывали с помощью теста хи-квадрат (пол) или с помощью бинарной логистической регрессии, скорректированной с учетом возраста, пола, BMI и центра набора (диабет).

[0042] На **фиг. 8А - В** показаны таблицы, обобщающие мета-анализы ассоциации между PSD3 rs71519934 и гистологическими признаками печени в когорте биопсии печени (LBC) и в независимой репликативной когорте EU. Мета-анализ обратной дисперсии двух исследований выполняли с применением пакета "мета" с моделями фиксированных и случайных эффектов в версии R 3.6.1. На **фиг. 8А** показаны результаты по тяжести стеатоза, тяжести фиброза, тяжести воспаления и тяжести баллонирования. На **фиг. 8В** показаны результаты наличия стеатоза, наличия фиброза, наличия воспаления и наличия баллонирования.

[0043] На **фиг. 9А - С** показано, что изоформа 001 мРНК PSD3 характеризуется самым высоким уровнем экспрессии в ткани печени человека, как описано в примере 1. На **фиг. 9А** показан уровень экспрессии различных изоформ мРНК PSD3 в ткани печени человека. Транскриптом от биоптатов печени подмножества из 77 индивидуумов миланской подгруппы когорты биопсии печени (LBC). Изоформа 001 (идентифицированная с помощью Ensembl как ENST00000327040 или идентифицированная с помощью NCBI как NP_056125 [изоформа a], 1047 aa) экспрессировалась на наивысшем уровне, за которым следовала изоформа 008 (идентифицированная Ensembl как ENST00000521841, некодирующая). На **фиг. 9В** показана общая экспрессия мРНК PSD3, стратифицированная по генотипу rs71519934. Различий в уровнях экспрессии мРНК PSD3 при стратификации по генотипу не обнаружили. Р-значение, рассчитанное с помощью линейной регрессии без корректировки. Значения подвергали логарифмическому преобразованию перед вводом в модель. На **фиг. 9С** показано, что уровни экспрессии общей мРНК NAT2 не различались у генотипов PSD3 rs71519934. Р-значение, рассчитанное с помощью линейной регрессии без корректировки. Значения подвергали логарифмическому преобразованию перед вводом в модель. Сокращения: FPKM, фрагменты на тысячу пар оснований экзонной модели на миллион картированных ридов; 186L: гомозиготы по аллелю L (n = 42); L186T: гетерозиготы (n = 29); 186T: гомозиготы по аллелю T (n = 6).

[0044] На **фиг. 10А - D** показано, что отрицательная регуляция PSD3 *in vitro* с применением siRNA в клетках McA-RH7777 по сравнению с клетками, трансфицированными скремблированной (Scr) siRNA, приводило в результате к более низкому внутриклеточному содержанию нейтрального жира (**фиг. 10А**), синтезу триглицеридов *de novo* (**фиг. 10В**) и секреции аполипопротеина b (Apo-b) (**фиг. 10С**) без различий в бета-окислении (**фиг. 10D**), как описано в примере 2. Содержание

внутриклеточного нейтрального жира визуализировали с помощью окрашивания ORO (верхние панели) и количественно определяли с помощью Biopix; синтез триглицеридов *de novo* измеряли как радиоактивно меченные вновь синтезированные триглицериды, разделенные с помощью TLC и количественно определяемые сцинтилляционным подсчетом через 15, 30, 60 минут после инкубации с 5 мКи/мл ^3H -глицерина плюс 50 мкМ олеиновой кислоты; секрецию Apo-b визуализировали с помощью SDS-PAGE и его количественного определения. Клетки обрабатывали в импульсном режиме с помощью 0,05 мКи/мл ^{35}S -Met/Cys + 50 мкМ ОА в течение 2 часов. Среды Чейза с избытком L-метионина и L-цистеина инкубировали в течение 5, 15, 30 или 60 мин. Apo-b подвергали иммунопреципитации из сред и визуализировали с помощью фосфоримиджера после разделения в SDS-PAGE. Для измерения бета-окисления использовали осажденный радиоактивно меченный пальмитат. Клетки инкубировали с 8,5 мКи/мл ^3H -пальмитата + 55 мкмоль/л пальмитиновой кислоты в течение 2 часов, после чего пальмитат осаждали с помощью BSA и перхлорной кислоты и количественно определяли сцинтилляционным подсчетом. Данные показаны как среднее значение \pm SD для описанных независимых экспериментов. Для каждой панели фигуры средняя эффективность отрицательной регуляции PSD3 составляла $\sim 80\%$ по оценке количественной ПЦР в режиме реального времени, анализируемой способом $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Р-значения, рассчитанные с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, сравнивающего siRNA Scr и siRNA PSD3. Сокр.: AU: условные единицы; RU: относительные единицы; dpm: распадов в минуту.

[0045] На **фиг. 11** показано, что отрицательная регуляция PSD3 с помощью siRNA в гепатоцитах крысы McA-RH7777 приводила к снижению уровня экспрессии генов, участвующих в липогенезе. Данные показаны как среднее значение и SD для 6 независимых экспериментов. Р-значения рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, сравнивая siRNA Scr и siRNA PSD3.

[0046] На **фиг. 12А - В** показаны эффекты отрицательной регуляции PSD3 с применением siRNA в immortalized гепатоцитах Huh7 человека. На **фиг. 12А** показан эффект на внутриклеточное содержание нейтрального жира по сравнению с клетками, трансфицированными скремблированной siRNA. Содержание внутриклеточного жира визуализировали с помощью окрашивания с помощью ORO (верхние панели), и площадь ORO определяли количественно с помощью Biopix. Эффективность отрицательной регуляции мРНК PSD3 составила $\sim 65\%$, по оценке

количественной ПЦР в режиме реального времени, анализируемой способом 2- $\Delta\Delta C_t$. Клетки высевали в трех повторностях и через 24 часа после посева трансфицировали скремблированной или PSD3-siRNA и выращивали в обычной среде без FBS плюс 25 мкМ ОА в течение 48 ч. На **фиг. 12В** показан эффект на синтез триглицеридов *de novo de novo*, измеренный с помощью вновь синтезированных триглицеридов, разделенных с помощью TLC, и количественно определенный сцинтилляционным подсчетом через 15, 30, 60 минут после инкубации с 5 мкКи/мл ^3H -глицерина плюс 50 мкМ олеиновой кислоты. Данные показаны как среднее значение и SD для описанных независимых экспериментов. Р-значения, рассчитанные с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, сравнивающего siRNA Scr и siRNA PSD3.

[0047] На **фиг. 13А-Г** показаны эффекты отрицательной регуляции PSD3 печени у самцов мышей C57BL/6, получавших диету, индуцирующую NASH, в общей сложности течение 50 недель на тяжесть стеатоза, воспаления и показатель активности NAFLD (NAS), как описано в примере 3. Во время последних 16 недель группам мышей вводили дозы один раз в неделю посредством подкожных инъекций физиологического раствора, контрольного GalNac-ASO (5 мг/кг/неделя) или PSD3 GalNac-ASO (5 мг/кг/неделя). PSD3 GalNac-ASO снижал уровни экспрессии мРНК PSD3 в печени (**фиг. 13А**) и был ассоциирован со снижением массы печени (**фиг. 13В**), общего содержания триглицеридов в печени, (**фиг. 13С**) уровней ALT в плазме крови, (**фиг. 13D**) уровней белка коллагена печени 1a1 (**фиг. 13Е**) и числа липидных капель печени (**фиг. 13F**). Лечение с помощью PSD3 GalNac-ASO также снижало тяжесть стеатоза и воспаления и показатель активности NAFLD, в то время как значительные изменения показателя фиброза печени отсутствовали (**фиг. 13G**). Данные показаны как среднее значение и SD. Р-значения рассчитывали с помощью одностороннего непараметрического критерия ANOVA Краскела-Уоллиса с последующей поправкой Данна для множественных сравнений. Проводили множественные сравнения, сравнивающие среднее значение каждой группы со средним значением контрольной группы (Ctr GalNac-ASO). Оценки тяжести заболевания печени анализировали с помощью порядкового регрессионного анализа.

[0048] На **фиг. 14А - Н** показаны эффекты отрицательной регуляции PSD3 печени у самцов мышей C57BL/6, получавших диету, индуцирующую NASH, в общей сложности течение 50 недель, как описано в примере 3. Во время последних 16 недель группам мышей вводили дозы один раз в неделю посредством подкожных инъекций

физиологического раствора, контрольного GalNac-ASO (5 мг/кг/неделя) или PSD3 GalNac-ASO (5 мг/кг/неделя). PSD3 GalNac-ASO не оказывал значительного эффекта на набор веса тела (**фиг. 14А**), но снижал уровни холестерина (**фиг. 14В**) и эфиров холестерина в печени (**фиг. 14С**) и уровни АСТ (**фиг. 14D**), холестерина (**фиг. 14Е**) и LDL-холестерина в плазме крови (**фиг. 14F**). Не наблюдались значительные эффекты на уровни триглицеридов (**фиг. 14G**) или HDL-холестерина в плазме крови (**фиг. 14H**). Данные показаны как среднее значение \pm SD. Р-значения рассчитывали с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса с последующими критериями множественных сравнений Данна. Множественные сравнения выполняли путем сравнения каждой группы с контрольной группой (Ctr GalNac-ASO).

[0049] На **фиг. 15** показаны эффекты отрицательной регуляции PSD3 печени у самцов мышей C57BL/6, получавших диету, индуцирующую NASH, в общей сложности течение 50 недель, как описано в примере 3. Во время последних 16 недель группам мышей вводили дозы один раз в неделю посредством подкожных инъекций физиологического раствора, контрольного GalNac-ASO (5 мг/кг/неделя) или PSD3 GalNac-ASO (5 мг/кг/неделя). мРНК печени количественно определяли с помощью цифрового профиля экспрессии генов и выражают в виде транскриптов на миллион (TPM). Обработка с помощью PSD3 GalNac ASO значительно снижала экспрессию мРНК *Acc1*, *Fasn* и *Scd1* в печени. Данные показаны как среднее значение и SD. Р-значения были рассчитаны с помощью одностороннего непараметрического критерия ANOVA Краскела-Уоллиса.

[0050] На **фиг. 16** показано, что минорный аллель PSD3 ассоциирован с более низкой распространенностью заболевания печени в когорте биопсии печени (LBC) после корректировки с учетом генетических факторов риска. Ассоциацию тестировали с помощью порядкового регрессионного анализа, скорректированного с учетом возраста, пола, BMI, центра набора, числа мутантных аллелей PNPLA3 I148M (n = 1950) и с дополнительной корректировкой с учетом других основных генетических факторов риска (TM6SF2 rs58542926 [E167K] (n = 1943), MBOAT7 rs641738 (n = 1938) и GCKR rs1260326 [L446P] (n = 1863) и наличие диабета), *данные доступны для n = 1805

[0051] На **фиг. 17** показана таблица участников исследования сердца в Далласе, стратифицированных по генотипу PSD3 L186T, как описано в примере 1. Р-значения были рассчитаны с помощью линейной регрессии, скорректированной с учетом возраста,

пола и BMI по мере необходимости и скорректированной или стратифицированной с учетом самостоятельно сообщаемой этнической принадлежности.

[0052] На **фиг. 18** показана ассоциация протонной плотности жировой фракции (PDFF) с PSD3 rs7003060 в целом и в пределах четырех страт BMS у британских участников европеоидного происхождения из Британского биобанка. Анализ проводили с применением линейной регрессии, скорректированной с учетом возраста, пола, BMI, первых 10 основных компонентов происхождения и типа массива.

[0053] На **фиг. 19A - C** показаны эффекты на уровни белка PSD3 и внутриклеточных липидов при сравнении первичных гепатоцитов человека от донора, гомозиготного по аллелю 186T, с таковыми от донора, гомозиготного по аллелю 186L, на 2D. На **фиг. 19A** показано внутриклеточное содержание нейтрального жира, визуализированное окрашиванием с помощью Oil Red O (ORO) и количественно определенное с помощью Biorex. Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение описанных независимых экспериментов. P-значения рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. На **фиг. 19B** показаны изображения клеток, культивируемых в бессывороточной обычной среде с добавлением 2% FBS, 10 мкМ ОА или 25 мкМ ОА, в течение 48 часов. Иммуноблоттинг проводили с общими клеточными лизатами для обнаружения PSD3 (NCBI: NP_056125, 1047 aa) с применением специально полученного антитела. На гистограмме показан относительный PSD3, рассчитанный как PSD3/калнексин. На **фиг. 19C** показано, что ключевые гены, участвующие в метаболизме липидов, которые были дифференциально экспрессированы, получены с помощью RNA-Seq. Данные представлены как Log2-кратное изменение экспрессии и $-\log_{10}$ p-значений. Сокр.: RU: относительные единицы, CNX: калнексин.

[0054] На **фиг. 20A - C** показано, что отрицательная регуляция PSD3 приводила в результате к более низким уровням активированного ARF6 (ARF-GTP). На **фиг. 20A** показано, что после преципитации активный ARF6-GTP был обнаружен с помощью иммуноблоттинга с применением антитела к ARF6, предоставленного в наборе. На **фиг. 20B** показано, что эффективность нокдауна показала снижение на ~ 60% для PSD3 и ~ 75% для ARF6 по оценке количественной ПЦР в режиме реального времени, анализируемой способом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. На **фиг. 20C** показано относительное соотношение ARF6-GTP (активное), рассчитанное как GTP-ARF6/калнексин. Данные показаны как среднее значение \pm SD для описанных независимых экспериментов. P-значения,

рассчитанные с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Сокращения: RU: относительные единицы, CNX: калнексин.

[0055] На **фиг. 21А - D** показано, что отрицательная регуляция PSD3 снижает внутриклеточное содержание нейтральных липидов в гепатоцитах, несущих любой аллель, при культивировании в 2D (**фиг. 21А - В**). Однако сайленсинг PSD3 снижает уровни внутриклеточных липидов только в первичных гепатоцитах, несущих аллель 186L, при культивировании в сфероидной модели 3D (**фиг. 21С - D**). Р-значения рассчитывали с помощью непараметрического теста Манна-Уитни, сравнивая siRNA SCR и siRNA PSD3. Сокращения: RU: относительные единицы, CNX: калнексин.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

[0056] "2'-Дезоксифуранозильный сахарный фрагмент" или "2'-дезоксифуранозильный сахар" означает фуранозильный сахарный фрагмент, имеющий два атома водорода в 2'-положении. 2'-Дезоксифуранозильные сахарные фрагменты могут являться немодифицированными или модифицированными, а также могут являться замещенными в положениях, отличных от 2'-положения, или незамещенными. Применительно к олигонуклеотиду β -D-2'-дезоксирибозильный сахарный фрагмент представляет собой незамещенный, немодифицированный 2'-дезоксифуранозил, и обнаруживается во встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК).

[0057] "2'-Дезоксинуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-Н(Н)-фуранозильный сахарный фрагмент, обнаруживаемый во встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК). В определенных вариантах осуществления 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное нуклеиновое основание или может содержать нуклеиновое основание РНК (урацил).

[0058] "2'-О-Метоксиэтил" (также 2'-МОЕ) относится к 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) вместо группы 2'-ОН рибозильного кольца. 2'-О-Метоксиэтил-модифицированный сахар является модифицированным сахаром.

[0059] "2'-МОЕ-нуклеозид" (также 2'-О-метоксиэтилнуклеозид) означает нуклеозид, содержащий 2'-МОЕ-модифицированный сахарный фрагмент.

[0060] "2'-Замещенный нуклеозид" или "2-модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-замещенный или 2'-модифицированный сахарный фрагмент. Как применяется в данном документе, "2'-замещенный" или "2-модифицированный" применительно к сахарному фрагменту означает, что сахарный

фрагмент содержит по меньшей мере одну 2'-замещающую группу, отличную от Н или ОН.

[0061] "5-Метилцитозин" означает цитозин с присоединенной в 5-положении метильной группой. 5-Метилцитозин представляет собой модифицированное нуклеиновое основание.

[0062] В настоящей заявке термин "приблизительно" применяется для обозначения того, что значение включает в себя вариацию ошибки, присущую способу/устройству, используемому для определения значения, или вариацию, существующую среди субъектов исследования. Как правило, термин "приблизительно" предназначен для охвата примерно или менее 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% вариабельности, в зависимости от ситуации.

[0063] Применение термина "или" в формуле изобретения применяется для обозначения "и/или", если явно не указано, что он относится только к альтернативам или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя настоящее изобретение поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или".

[0064] "Антисмысловой олигонуклеотид" или "ASO" означает олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени или ее области или сегменту. Антисмысловой олигонуклеотид способен специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью или ее областью или сегментом, гибридизация которых приводит в результате к опосредованному РНКазой Н расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени.

[0065] "Бициклический сахар" или "бициклический сахарный фрагмент" означает модифицированный сахарный компонент, содержащий два кольца, где второе кольцо образовано с помощью мостика, соединяющего два атома в первом кольце, за счет чего обеспечивается образование бициклической структуры. В определенных вариантах осуществления первое кольцо бициклического сахарного фрагмента представляет собой фуранозильный фрагмент. "Бициклический нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент.

[0066] "Конъюгированная группа" означает группу атомов, которая непосредственно присоединена к полинуклеотиду. В определенных вариантах осуществления конъюгированные группы содержат фрагмент конъюгата и конъюгирующий линкер, который присоединяет фрагмент конъюгата к полинуклеотиду.

[0067] "Затрудненный этил", или "сEt", или "модифицированный сEt сахарный фрагмент" означает бициклический β -D-рибозильный сахарный фрагмент, где второе кольцо бициклического сахара образовано посредством мостика, соединяющего 4'-атом углерода и 2'-атом углерода β -D-рибозильного сахарного фрагмента, при этом мостик характеризуется формулой 4'-CH(CH₃)-O-2'. "сEt-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент сEt.

[0068] "Смежный" применительно к олигонуклеотиду относится к нуклеозидам, нуклеиновым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеозидным связям, которые непосредственно примыкают друг к другу. Например, "смежные нуклеиновые основания" означают нуклеиновые основания, которые непосредственно примыкают друг к другу в последовательности.

[0069] "Гэпмер" означает антисмысловой олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, имеющую несколько нуклеозидов, которые способствуют расщеплению под действием РНКазы H, расположенную между внешними областями, имеющими один или несколько нуклеозидов, где нуклеозиды, образующие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, образующих внешние области. Внутренняя область может называться "гэпом", а внешние области могут называться "флангами". В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид представляет собой гэпмер.

[0070] "Межнуклеозидная связь" представляет собой ковалентную связь между соседними нуклеозидами в полинуклеотиде. Применяемая в данном документе "модифицированная межнуклеозидная связь" означает любую межнуклеозидную связь, отличную от фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. "Фосфоротиоатная межнуклеозидная связь" представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода фосфодиэфирной межнуклеозидной связи замещен атомом серы.

[0071] Под "неравновесным сцеплением" понимают неслучайную ассоциацию аллелей в различных локусах в данной популяции. Аллели в положительном неравновесном сцеплении встречаются вместе с гораздо большей частотой, чем можно было бы ожидать, если бы они были ассоциированы случайным образом, тогда как аллели в отрицательном неравновесном сцеплении встречаются вместе с гораздо более низкой частотой, чем можно было бы ожидать, если бы они были ассоциированы случайным образом.

[0072] "Связанные нуклеозиды" означают соседние нуклеозиды, связанные между собой межнуклеозидной связью.

[0073] "Несовпадающее" или "некомплементарное" означает нуклеиновое основание первого полинуклеотида, которое не является комплементарным соответствующему нуклеиновому основанию второго полинуклеотида или нуклеиновой кислоты-мишени при выравнивании первого и второго полинуклеотидов. Например, нуклеиновые основания, в том числе без ограничения универсальные нуклеиновые основания инозин и гипоксантин, способны гибридизоваться с по меньшей мере одним нуклеиновым основанием, но тем не менее являются несовпадающими или некомплементарными в отношении нуклеинового основания, с которым они гибридизируются. В качестве другого примера нуклеиновое основание первого полинуклеотида, которое не способно гибридизоваться с соответствующим нуклеиновым основанием второго полинуклеотида или нуклеиновой кислоты-мишени при выравнивании первого и второго полинуклеотидов является несовпадающим или некомплементарным нуклеиновым основанием.

[0074] "Нуклеозиды выступающих концов" относятся к неспаренным нуклеотидам на либо одном, либо обоих концах дуплекса, образованного гибридизацией антисмыслового олигонуклеотида RNAi и смыслового олигонуклеотида RNAi.

[0075] Нуклеиновое основание может быть встречающимся в природе или синтетическим. Нуклеиновое основание и сахарное основание могут быть независимо друг от друга модифицированными или немодифицированными. "Модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание и/или модифицированный сахарный фрагмент. Модифицированные нуклеозиды могут предусматривать нуклеозиды с удаленными нуклеиновыми основаниями, у которых отсутствует нуклеиновое основание.

[0076] "Фосфоротиоатная связь" означает модифицированную фосфатную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода замещен атомом серы. Фосфоротиоатная межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

[0077] "Участок" означает определенное число смежных (т. е. связанных) нуклеиновых оснований нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления фрагмент представляет собой определенное число смежных нуклеиновых оснований нуклеиновой кислоты-мишени. В определенных вариантах

осуществления фрагмент представляет собой определенное количество смежных нуклеиновых оснований олигомерного соединения.

[0078] "Полинуклеотид" означает полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным независимо друг от друга. Если не указано иное, полинуклеотиды состоят из 8-80 связанных нуклеозидов. "Модифицированные полинуклеотиды" означают полинуклеотиды, где по меньшей мере один сахар, нуклеиновое основание или межнуклеозидная связь являются модифицированными. "Немодифицированные полинуклеотиды" означают полинуклеотиды, которые не содержат какую-либо модификацию сахара, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи.

[0079] "Ген" относится к совокупности нуклеотидов, которые кодируют полипептид, и включает кДНК и молекулы нуклеиновой кислоты геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления "ген" также относится к некодирующему фрагменту нуклеиновой кислоты, который может действовать как регуляторная последовательность, предшествующая кодирующей последовательности (т. е. 5') и следующая за кодирующей последовательностью (т. е. 3').

[0080] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула РНК, описанная в данном документе, может гибридизоваться с последовательностью, представляющей интерес, например, последовательностью ДНК или последовательностью РНК. Молекула нуклеиновой кислоты является "способной к гибридизации" или "гибридизованной" с другой молекулой нуклеиновой кислоты, такой как кДНК, геномная ДНК или РНК, когда одонитевая форма молекулы нуклеиновой кислоты может подвергаться отжигу с другой молекулой нуклеиновой кислоты при соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора. Без ограничения конкретным механизмом, наиболее распространенный механизм гибридизации предполагает образование водородных связей, которое может представлять собой образование водородных связей по типу уотсон-криковского, хугстиновского или обратного хугстиновского взаимодействия между комплементарными нуклеиновыми основаниями. В некоторых вариантах осуществления комплементарные молекулы нуклеиновой кислоты включают без ограничения антисмысловое соединение и нуклеиновую кислоту-мишень. В некоторых вариантах осуществления комплементарные молекулы нуклеиновой кислоты включают без ограничения полинуклеотид и нуклеиновую кислоту-мишень.

[0081] "Способный к специфической гибридизации" относится к полинуклеотиду, характеризующемуся достаточной степенью комплементарности между полинуклеотидом и нуклеиновой кислотой-мишенью для индуцирования желаемого эффекта, проявляющему в то же время минимальные эффекты или не проявляющему такие эффекты в отношении нуклеиновых кислот, не являющихся мишенями. В определенных вариантах осуществления специфическая гибридизация происходит в физиологических условиях.

[0082] Термин "комплементарный" применяется для описания взаимосвязи между нуклеотидными основаниями и/или полинуклеотидами, которые способны к гибридизации друг с другом, например, нуклеотидная последовательность таких полинуклеотидов или одна или несколько их областей совпадает с нуклеотидной последовательностью другого полинуклеотида или одной или нескольких его областей, когда две нуклеотидные последовательности выровнены в противоположных направлениях. Описанные в данном документе совпадения нуклеиновых оснований или комплементарные нуклеиновые основания включают следующие пары: аденин (A) с тиминном (T), аденин (A) с урацилом (U), цитозин (C) с гуанином (G) и 5-метилцитозин (^mC) с гуанином (G). Комплементарные полинуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не обязательно должны характеризоваться комплементарностью нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду и могут содержать одно или несколько несовпадений нуклеиновых оснований. Соответственно, в настоящем изобретении также включены выделенные полинуклеотиды, которые комплементарны последовательностям, раскрытым или применяемым в данном документе, а также существенно сходным последовательностям нуклеиновых кислот. Степень, в которой два полинуклеотида имеют совпадающие нуклеиновые основания, может быть выражена в терминах "процент комплементарности" или "процент комплементарных". В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид характеризуется 70%, по меньшей мере 70%, 75%, по меньшей мере 75%, 80%, по меньшей мере 80%, 85%, по меньшей мере 85%, 90%, по меньшей мере 90%, 95%, по меньшей мере 95%, 97%, по меньшей мере 97%, 98%, по меньшей мере 98%, 99% или по меньшей мере 99% или 100% комплементарностью с другим полинуклеотидом или нуклеиновой кислотой-мишенью, предусмотренными в данном документе. В вариантах осуществления, в которых два полинуклеотида или полинуклеотид и нуклеиновая кислота-мишень являются "полностью комплементарными" или "комплементарными на 100%", такие

полинуклеотиды имеют совпадения нуклеиновых оснований в каждом нуклеозиде без каких-либо несовпадений нуклеиновых оснований. Если не указано иное, процент комплементарности представляет собой процент нуклеиновых оснований более короткой последовательности, которые комплементарны по отношению к более длинной последовательности.

[0083] "Кодирующая последовательность" ДНК представляет собой одну из цепей двунитевой последовательности ДНК, которая транскрибируется и транслируется в полипептид в клетке *in vitro* или *in vivo*, когда она находится под контролем подходящих регуляторных последовательностей. "Регуляторные последовательности" относятся к некодирующим полинуклеотидным последовательностям, расположенным выше (т. е. 5'), в пределах или ниже (т. е. 3') кодирующей последовательности и которые влияют на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайт процессинга РНК, эффекторный сайт связывания и структуру "стебель-петля". Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5'-(амино)-конце и стоп-кодом трансляции на 3'-(карбоксил)-конце. Кодирующая последовательность может включать без ограничения полинуклеотиды бактерий и архей, кДНК из мРНК, полинуклеотиды геномной ДНК и полинуклеотиды синтетической ДНК. Если кодирующая последовательность предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно располагаются на 3'-конце кодирующей последовательности.

[0084] "PSD3" означает либо нуклеиновую кислоту, либо белок гена, *белок 3, содержащий домен плекстрина и Sec7*. "Нуклеиновая кислота PSD3" означает любую нуклеиновую кислоту, кодирующую PSD3. Например, в определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота PSD3 содержит последовательность ДНК, кодирующую PSD3, последовательность РНК, транскрибируемую из ДНК, кодирующей PSD3 (в том числе геномной ДНК, содержащей интроны и экзоны), и последовательность мРНК, кодирующую PSD3. "мРНК PSD3" означает мРНК, кодирующую белок PSD3. Мишень может быть указана в верхнем или нижнем регистре.

[0085] Применяемые в данном документе термины "сходство последовательностей" или "% сходства" относятся к степени идентичности или

соответствия между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями. В контексте полинуклеотидов "сходство последовательностей" может относиться к последовательностям нуклеиновых кислот, где изменения в одном или нескольких нуклеотидных основаниях приводят в результате к замене одной или нескольких аминокислот, но не влияют на функциональные свойства белка, кодируемого полинуклеотидом. "Сходство последовательностей" может также относиться к модификациям полинуклеотида, таким как делеция или вставка одного или нескольких нуклеотидных оснований, которые существенно не влияют на функциональные свойства полученного в результате транскрипта. Поэтому следует понимать, что настоящее изобретение охватывает больше, чем конкретные иллюстративные последовательности. Известны способы замены нуклеотидных оснований, а также способы определения сохранения биологической активности кодируемого полипептида.

[0086] Сходство последовательностей можно определить путем выравнивания последовательностей с применением способов, известных в данной области техники, таких как, например, BLAST, MUSCLE, Clustal (включая ClustalW и ClustalX) и T-Coffee (включая варианты, такие как, например, M-Coffee, R-Coffee и Espresso). В некоторых вариантах осуществления только конкретные части двух или нескольких полинуклеотидных или полипептидных последовательностей выравнивают для определения идентичности последовательностей. В некоторых вариантах осуществления только конкретные домены двух или нескольких последовательностей выравниваются для определения сходства последовательностей. Окно сравнения может представлять собой сегмент из от по меньшей мере 10 до более чем 1000 остатков, от по меньшей мере 20 до приблизительно 1000 остатков или от по меньшей мере 50 до 500 остатков, в котором последовательности могут быть выровнены и сравнены. Способы выравнивания для определения идентичности последовательностей хорошо известны и могут быть выполнены с применением общедоступных баз данных, таких как BLAST. Например, в некоторых вариантах осуществления "процент идентичности" двух нуклеотидных последовательностей определяют с применением алгоритма Карлина и Альтшула, Proc Nat Acad Sci USA 87:2264-2268 (1990), модифицированного как в Karlin and Altschul, Proc Nat Acad Sci USA 90:5873-5877 (1993). Такие алгоритмы включены в программы BLAST, например, BLAST+ или программы NBLAST и XBLAST, описанные в Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410 (1990). Поиск белка согласно BLAST можно выполнить с помощью таких программ, как, например, программа XBLAST, оценка = 50,

длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка по настоящему изобретению. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res 25(17): 3389-3402 (1997). При применении программ BLAST и Gapped BLAST можно выбирать параметры соответствующих программ по умолчанию (например, XBLAST и NBLAST).

Способы

[0087] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения или предупреждения жировой болезни печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта, за счет чего обеспечивается лечение или предупреждение жировой болезни печени у субъекта.

[0088] PSD3, антиген, ассоциированный с гепатоцеллюлярной карциномой, представляет собой фактор обмена гуанина, который активирует фактор ADP-рибозилирования 6 (ARF6). См., напр., Wang et al., J Immunol 169, 1102-1109 (2002), Donaldson et al., Nat Rev Mol Cell Biol 12, 362-375 (2011) и Franco et al., EMBO J 18, 1480-1491 (1999). PSD3 представляет собой белок с 18 аннотированными изоформами (выпуск Ensembl 75), из которых наиболее распространенными являются изоформа a (NP_056125, 1047 aa) и изоформа b (NP_996792, 513 aa). Было обнаружено, что в печени изоформа-a экспрессируется на более высоком уровне, чем изоформа b. В некоторых вариантах осуществления "PSD3", упомянутый в данном документе, представляет собой изоформу-а PSD3. В некоторых вариантах осуществления "PSD3", упомянутый в данном документе, представляет собой изоформу b PSD3. В некоторых вариантах осуществления "PSD3", упомянутый в данном документе, не ограничивается конкретной изоформой и может относиться к любой изоформе PSD3.

[0089] Исследования с применением полногеномного исследования ассоциаций, раскрытые в данном документе, идентифицировали вариант PSD3 с заменой лейцина на треонин в положении аминокислоты 186 (сокращенно в данном документе "PSD3 L186T", "L186T" или "аллельный вариант 186T"), который потенциально придает защиту от всего спектра заболеваний печени. В частности, этот вариант PSD3 был ассоциирован с более низкой распространенностью стеатоза, воспаления, баллонирования и фиброза. Для субъектов с заболеванием печени и тех, у которых имеется вариант PSD3 L186T,

тяжесть заболевания печени была ниже по всему спектру. Носители варианта PSD3 L186T имели более низкий уровень общего холестерина в плазме и LDL-холестерина.

[0090] Неожиданно было обнаружено, что замена L186T привела в результате к потере функции PSD3 в отношении активности его фактора гуанинового обмена и катализа фактора ADP-рибозилирования 6 (ARF6) из его неактивной формы ARF6-GDP в активную форму ARF6-GTP. В частности, PSD3 дикого типа (186L) активировал ARF6, в то время как вариант PSD3 L186T снижал активацию ARF6.

[0091] Предполагалось, что отрицательная регуляция PSD3 у субъекта с заболеванием печени будет обеспечивать такую же защиту, как и мутантный PSD3 с потерей функции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, в клетке субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется жировая болезнь печени или он подвержен риску ее развития.

[0092] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения уровня холестерина у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта понижен LDL-холестерин. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется жировая болезнь печени или он подвержен риску ее развития.

[0093] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения активации фактора ADP-рибозилирования 6 (ARF6), при этом способ включает понижение экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3 у субъекта, где более низкий уровень экспрессии PSD3 обеспечивает сниженную активацию ARF6.

[0094] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения содержания внутриклеточного жира в клетке печени у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего

полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7 (PSD3)*, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется жировая болезнь печени или он подвержен риску ее развития.

[0095] В определенных вариантах осуществления соединения содержат полинуклеотид или состоят из полинуклеотида, содержащего область, которая является комплементарной нуклеиновой кислоте-мишени, где нуклеиновая кислота-мишень представляет собой РНК PSD3. В каждом из вариантов осуществления, описанных выше, соединение может быть нацелено на РНК PSD3. В определенных вариантах осуществления РНК PSD3 содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20 (номер доступа в GENBANK: NM_015310.3). В определенных вариантах осуществления приведение клетки в контакт с соединением, содержащим полинуклеотид, комплементарный последовательности под SEQ ID NO: 20, снижает количество РНК PSD3 и в определенных вариантах осуществления снижает количество белка PSD3. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления клетка находится в субъекте, нуждающемся в этом. В определенных вариантах осуществления введение субъекту соединения, содержащего полинуклеотид, комплементарный последовательности под SEQ ID NO: 20, приводит в результате к снижению повреждения печени, стеатоза, фиброза печени, воспаления печени, рубцевания или цирроза печени, печеночной недостаточности у субъекта. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида и конъюгированной группы. В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой соединение на основе siRNA.

Соединения

[0096] В некоторых вариантах осуществления соединение выбрано из антисмыслового олигонуклеотида, siRNA или ssRNAi. В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой рибозим.

[0097] В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой одонитевой полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления одонитевой полинуклеотид способен связываться с комплементарным полинуклеотидом с

образованием двунитевого дуплекса. В некоторых вариантах осуществления однонитевой полинуклеотид содержит самокомплементарную последовательность. "Самокомплементарный" означает, что полинуклеотид может по меньшей мере частично гибридизоваться сам с собой. В некоторых вариантах осуществления однонитевой полинуклеотид содержит полинуклеотид РНК. В некоторых вариантах осуществления однонитевой полинуклеотид представляет собой ssRNA или антисмысловый олигонуклеотид (ASO).

[0098] В некоторых вариантах осуществления соединение является двунитевым. Такие двунитевые соединения содержат первый полинуклеотид, имеющий область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени (и антисмысловый полинуклеотид RNAi), и второй полинуклеотид, имеющий область, комплементарную первому полинуклеотиду (смысловый полинуклеотид RNAi). В некоторых вариантах осуществления двунитевое соединение содержит полинуклеотид ДНК. В определенных вариантах осуществления соединение содержит полинуклеотид РНК. В таких вариантах осуществления нуклеиновые основания тимина в полинуклеотидах замещены нуклеиновыми основаниями урацила. Полинуклеотиды двунитевых соединений могут содержать некомплементарные нуклеозиды выступающих концов. В определенных вариантах осуществления соединение содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов, у которых в 2'-положении в сахарном остатке содержится галоген (такой как группа фтора; 2'-F) или содержится алкоксигруппа (такая как метоксигруппа; 2'-OMe). В определенных вариантах осуществления соединение содержит по меньшей мере одну 2'-F-модификацию сахара и по меньшей мере одну 2'-OMe-модификацию сахара. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна 2'-F-модификация сахара и по меньшей мере одна 2'-OMe-модификация сахара расположены в виде чередующегося паттерна на протяжении по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеиновых оснований вдоль нити соединения. В определенных вариантах осуществления соединение содержит между примыкающими нуклеозидами одну или несколько связей, отличных от встречающейся в природе фосфодиэфирной связи. Примеры таких связей включают фосфорамидные, фосфоротиоатные и дифосфоротиоатные связи. Соединения также могут представлять собой химически модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, как раскрыто в патенте США № 6673661. В других вариантах осуществления соединение содержит одну

или две экпированные нити, как раскрыто, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 г. Примером двуниевых соединений является siRNA.

[0099] В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой соединения на основе интерферирующей РНК (для RNAi), которые включают соединения на основе двуниевой РНК (также называемые короткими интерферирующими РНК или siRNA) и соединения на основе однониевой RNAi (или ssRNA). Такие соединения осуществляют свою функцию по меньшей мере частично посредством сигнального пути RISC с разрушением и/или секвестрацией нуклеиновой кислоты-мишени (следовательно, включают в себя соединения на основе microRNA/миметиков microRNA). Подразумевается, что применяемый в данном документе термин "siRNA" эквивалентен другим терминам, применяемым для описания молекул нуклеиновой кислоты, которые способны опосредовать RNAi, специфичную в отношении последовательности, например, короткой интерферирующей РНК (siRNA), двуниевой РНК (dsRNA), microRNA (miRNA), короткой шпилечной РНК (shRNA), короткому интерферирующему полинуклеотиду, короткой интерферирующей нуклеиновой кислоте, короткому интерферирующему модифицированному полинуклеотиду, химически модифицированной siRNA, РНК для посттранскрипционного сайленсинга генов (ptgsRNA) и другим. Кроме того, подразумевается, что применяемый в данном документе термин "RNAi" эквивалентен другим терминам, применяемым для описания РНК-интерференции, специфичной в отношении последовательности, таким как посттранскрипционный сайленсинг генов, подавление трансляции или эпигенетические механизмы.

[00100] При определенных формах антисмысловой активности гибридизация соединения, описанного в данном документе, с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит в результате к привлечению белка, который расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень. Например, определенные соединения, описанные в данном документе, приводят в результате к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени, опосредованному РНКазой H. РНКазы H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. ДНК в таком дуплексе РНК:ДНК не обязательно должна быть немодифицированной ДНК. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются достаточно "ДНК-подобными", чтобы вызывать активность РНКазы H. Кроме того, в определенных вариантах

осуществления допускаются один или несколько нуклеозидов, не являющихся ДНК-подобными, в гэпе гэпмера.

[00101] При определенных формах антисмысловой активности соединения, описанные в данном документе, или фрагмент соединения включаются в состав РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC), что в конечном счете приводит в результате к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени. Например, определенные соединения, описанные в данном документе, в результате обеспечивают расщепление нуклеиновой кислоты-мишени с помощью белка Argonaute. Соединения, которые включаются в состав RISC, являются соединениями на основе RNAi. Соединения на основе RNAi могут быть двунитевыми (siRNA) или однопонитевыми (ssRNA).

Соединения на основе RNAi

[00102] Соединения на основе RNAi содержат антисмысловую полинуклеотид RNAi и необязательно смысловую полинуклеотид RNAi. Соединения на основе RNAi могут также содержать концевые группы и/или конъюгированные группы, которые могут быть присоединены к антисмысловому полинуклеотиду RNAi или смысловому полинуклеотиду RNAi (при наличии).

[00103] Соединения на основе RNAi, содержащие антисмысловую полинуклеотид RNAi и смысловую полинуклеотид RNAi, могут образовывать дуплекс, поскольку смысловая полинуклеотид RNAi содержит антисмысловую гибридирующую область, который является комплементарным антисмысловому полинуклеотиду RNAi. В определенных вариантах осуществления каждое нуклеиновое основание антисмыслового полинуклеотида RNAi и смыслового полинуклеотида RNAi комплементарно друг другу. В определенных вариантах осуществления два полинуклеотида RNAi имеют по меньшей мере одно несовпадение друг с другом.

[00104] В определенных вариантах осуществления антисмысловая область гибридизации составляет всю длину смыслового полинуклеотида RNAi и антисмыслового полинуклеотида RNAi. В определенных вариантах осуществления один или оба из антисмыслового полинуклеотида RNAi и смыслового полинуклеотида RNAi содержат дополнительные нуклеозиды на одном или обоих концах, которые не гибридизуются (нуклеозиды выступающих концов). В определенных вариантах осуществления нуклеозиды выступающих концов представляют собой ДНК. В определенных вариантах осуществления нуклеозиды выступающих концов связаны друг

с другом (где их более одного) и с первым нуклеозидом не выступающих концов с фосфоротиоатными связями.

Полинуклеотиды

[00105] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, состоящий из 8-50 связанных нуклеозидов и характеризующийся по меньшей мере 90% комплементарностью последовательности по отношению к участку нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей PSD3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и характеризуется по меньшей мере 90% комплементарностью последовательности по отношению к участку нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей PSD3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 12-20 связанных нуклеозидов и характеризуется по меньшей мере 90% комплементарностью последовательности по отношению к участку нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей PSD3.

[00106] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 8-80 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 8-50 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 12-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 12-22 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 14-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 15-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 16-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 17-30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 12-20 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 15-20 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 16-20 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид состоит из приблизительно 8, приблизительно

9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19 или приблизительно 20 связанных нуклеозидов.

[00107] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% участку нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей PSD3 (SEQ ID NO: 2-18).

[00108] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, способную гибридизоваться с участком нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей PSD3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая PSD3, содержит последовательность под SEQ ID NO: 2-18. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

[00109] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% участку нуклеиновой кислоты равной длины сайта инициации транскрипции, сайта инициации трансляции, 5'-нетранслируемой последовательности, 3'-нетранслируемой последовательности, кодирующей последовательности, последовательности пре-мРНК и/или соединения интрон/экзон мРНК, кодирующей белок PSD3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную на 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%, по меньшей мере 99% или приблизительно 100% участку нуклеиновой кислоты равной длины сайта инициации транскрипции, сайта инициации трансляции, 5'-нетранслируемой последовательности, 3'-нетранслируемой последовательности, кодирующей последовательности, последовательности пре-мРНК и/или соединения интрон/экзон мРНК, кодирующей белок PSD3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет

последовательность нуклеиновых оснований, способных гибридизоваться с участком равной длины или со всем сайтом инициации транскрипции, сайтом инициации трансляции, 5'-нетранслируемой последовательностью, 3'-нетранслируемой последовательностью, кодирующей последовательностью, последовательностью пре-мРНК и/или соединением интрон/экзон мРНК, кодирующей белок PSD3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% участку равной длины любой из последовательности под SEQ ID NO: 2-18. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную на 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%, по меньшей мере 99% или приблизительно 100% участку равной длины любой из последовательности под SEQ ID NO: 2-18. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, способную к гибридизации с участком равной длины любой из последовательности под SEQ ID NO: 2-18.

[00110] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере одну модификацию, выбранную из по меньшей мере одной модифицированной межнуклеозидной связи, по меньшей мере одного модифицированного сахарного фрагмента и по меньшей мере одного модифицированного нуклеинового основания.

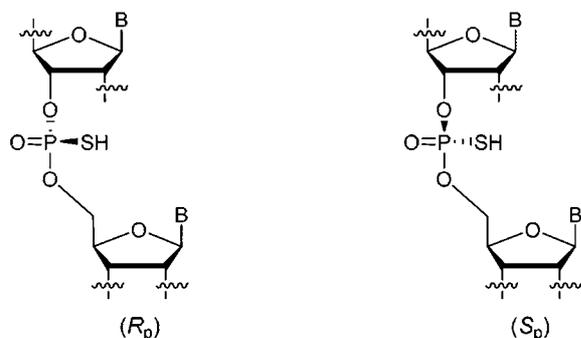
[00111] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь. Встречающаяся в природе межнуклеозидная связь в РНК и ДНК представляет собой 3'-5'-фосфодифирную связь. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, имеющие одну или несколько модифицированных, т. е. не встречающихся в природе, межнуклеозидных связей, зачастую предпочтительнее полинуклеотидов со встречающимися в природе межнуклеозидными связями ввиду наличия у них желательных свойств, таких как, например, повышенное поглощение

клетками, повышенное сродство к нуклеиновым кислотам-мишеням и увеличенная стабильность в присутствии нуклеаз.

[00112] В некоторых вариантах осуществления нуклеозиды модифицированных полинуклеотидов могут быть связаны друг с другом с помощью любой межнуклеозидной связи. Два основных класса межнуклеозидных связывающих групп определяются наличием или отсутствием атома фосфора. Иллюстративные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают без ограничения фосфатные связи, которые охватывают фосфодиэфирную связь ("P=O") (также называемые немодифицированными или встречающимися в природе связями), фосфотриэфирные, метилфосфонатные, фосфорамидатные, а также фосфоротиоатные ("P=S") и дифосфоротиоатные ("HS-P=S") связи. Иллюстративные не содержащие фосфор межнуклеозидные связывающие группы включают без ограничения метилениметилиминогруппу (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂), тиодиэфирную, тионокарбаматную (-O-C(=O)(NH)-S-), силоксановую (-O-SiH₂-O-) и N,N'-диметилгидразиновую (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-) группы. Модифицированные межнуклеозидные связи, в отличие от встречающихся в природе фосфатных связей, можно применять для изменения, как правило, увеличения, устойчивости полинуклеотида к действию нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидные связи, имеющие хиральный атом, получают в виде рацемической смеси или в виде отдельных энантиомеров. Способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор межнуклеозидных связей известны специалистам в данной области техники.

[00113] Иллюстративные хиральные межнуклеозидные связи включают без ограничения алкилфосфонатные и фосфоротиоатные связи. Модифицированные полинуклеотиды, описанные в данном документе, содержащие межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, можно получить в виде совокупностей полинуклеотидов, содержащих стереослучайные межнуклеозидные связи, или в виде совокупностей полинуклеотидов, содержащих фосфоротиоатные связи в конкретных стереохимических конфигурациях. В определенных вариантах осуществления совокупности полинуклеотидов содержат фосфоротиоатные межнуклеозидные связи, где все из фосфоротиоатных межнуклеозидных связей являются стереослучайными. Такие полинуклеотиды можно получать с применением таких способов синтеза, которые приводят в результате к случайному выбору стереохимической конфигурации каждой фосфоротиоатной связи. Тем не менее, каждый отдельный фосфоротиоат каждой

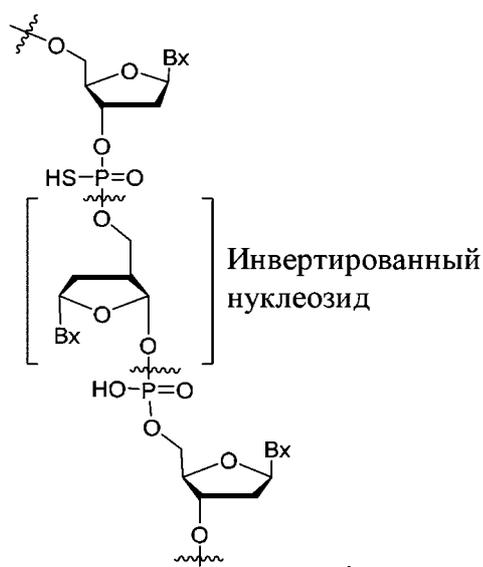
отдельной молекулы полинуклеотида имеет определенную стереоконфигурацию. В определенных вариантах осуществления совокупности полинуклеотидов обогащены полинуклеотидами, содержащими одну или несколько конкретных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей в конкретной, независимо выбранной стереохимической конфигурации. В определенных вариантах осуществления конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 65% молекул в совокупности. В определенных вариантах осуществления конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 70% молекул в совокупности. В определенных вариантах осуществления конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 80% молекул в совокупности. В определенных вариантах осуществления конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 90% молекул в совокупности. В определенных вариантах осуществления конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной связи присутствует в по меньшей мере 99% молекул в совокупности. Такие хирально обогащенные совокупности полинуклеотидов можно получить с применением способов синтеза, известных из уровня техники, например, способов, описанных в Oka et al., *JACS* 125, 8307 (2003), Wan et al. *Nuc. Acid. Res.* 42, 13456 (2014) и WO 2017/015555. В определенных вариантах осуществления совокупность полинуклеотидов обогащена полинуклеотидами, имеющими по меньшей мере один указанный фосфоротиоат в (*Sp*)-конфигурации. В определенных вариантах осуществления совокупность полинуклеотидов обогащена полинуклеотидами, имеющими по меньшей мере один фосфоротиоат в (*Rp*)-конфигурации. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие (*Rp*)- и/или (*Sp*)-фосфоротиоаты, предусматривают одну или несколько из следующих формул, где "B" указывает на нуклеиновое основание:



[00114] Если не указано иное, хиральные межнуклеозидные связи полинуклеотидов RNAi, описанных в данном документе, могут быть стереослучайными или быть представлены в конкретной стереохимической конфигурации. Способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор межнуклеозидных связей известны специалистам в данной области техники.

[00115] Нейтральные межнуклеозидные связи включают без ограничения фосфотриэфирные, метилфосфонатные связи, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), 3-амидную (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), 4-амидную (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), формацетальную (3'-O-CH₂-O-5'), метоксипропильную и тиоформацетальную связи (3'-S-CH₂-O-5'). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, включающие силоксановую (диалкилсилоксановую), карбоксилатную сложноэфирную, карбоксамидную, сульфидную, сульфонатную сложноэфирную и амидные связи (см., например: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Chapters 3 and 4, 40-65). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие комбинацию составляющих частей N, O, S и CH₂.

[00116] В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды (такие как антисмысловые полинуклеотиды RNAi и/или смысловые полинуклеотиды RNAi) содержат один или несколько инвертированных нуклеозидов, как показано ниже:



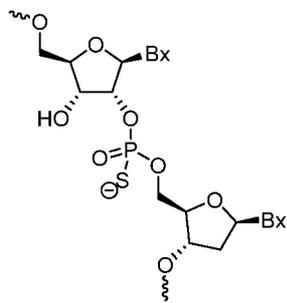
где каждый Bx независимо представляет собой любое нуклеотидное основание.

[00117] В определенных вариантах осуществления инвертированный нуклеозид является конечным (т. е. последним нуклеозидом на одном конце олигонуклеотида), и

поэтому будет присутствовать только одна межнуклеозидная связь, изображенная выше. В определенных подобных вариантах осуществления к инвертированному нуклеозиду могут быть присоединены дополнительные элементы (например, конъюгированная группа). Такие концевые инвертированные нуклеозиды могут быть присоединены к одному или обоим концам полинуклеотида.

[00118] В определенных вариантах осуществления в таких группах отсутствует нуклеиновое основание и они обозначаются в данном документе как инвертированные сахарные фрагменты. В определенных вариантах осуществления инвертированный сахарный фрагмент является концевым (т. е. присоединен к последнему нуклеозиду на одном конце полинуклеотида), и поэтому будет присутствовать только одна межнуклеозидная связь, указанная выше. В определенных подобных вариантах осуществления к инвертированному сахарному фрагменту могут быть присоединены дополнительные элементы (например, конъюгированная группа). Такие концевые инвертированные сахарные фрагменты могут быть присоединены к одному или обоим концам полинуклеотида.

[00119] В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут быть связаны 2' с 5', а не с помощью стандартной связи 3' с 5'. Такая связь показана ниже.



где каждый Bx представляет собой любое нуклеотидное основание.

[00120] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды содержат модифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль полинуклеотида или его области в виде определенного паттерна или мотива из модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидные связи расположены в виде мотива, содержащего гэп. В таких вариантах осуществления межнуклеозидные связи в каждой из двух фланговых областей отличаются от межнуклеозидных связей в области гэпа. В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидные связи во флангах являются фосфодифирными, а межнуклеозидные связи в гэпе являются фосфотиоатными. Нуклеозидный мотив выбирают независимо,

так что такие полинуклеотиды, имеющие мотив из межнуклеозидных связей, содержащий гэп, могут иметь или могут не иметь нуклеозидный мотив, содержащий гэп, и если они действительно имеют нуклеозидный мотив, содержащий гэп, то длина флангов и гэпа может быть или может не быть одинаковой.

[00121] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды содержат область, имеющую мотив из чередующихся межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды содержат область с однородно модифицированными межнуклеозидными связями. В таких вариантах осуществления полинуклеотид содержит область, имеющую однородные связи, представляющие собой фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет однородные фосфоротиоатные связи. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь полинуклеотида выбрана из фосфодиэфирной и фосфоротиоатной. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь полинуклеотида выбрана из фосфодиэфирной и фосфоротиоатной, и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь является фосфоротиоатной.

[00122] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере 8 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере 10 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 6 последовательно расположенных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 8 последовательно расположенных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 10 последовательно расположенных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 12 последовательно расположенных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых подобных вариантах осуществления по меньшей мере один такой блок расположен на 3'-конце полинуклеотида. В некоторых подобных

вариантах осуществления по меньшей мере один такой блок расположен в пределах 3 нуклеозидов на 3'-конце полинуклеотида.

[00123] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды содержат одну или несколько метилфосфонатных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, имеющие гепмерный нуклеозидный мотив, содержат мотив из связей, содержащий связи, все из которых являются фосфоротиоатными, за исключением одной или двух метилфосфонатных связей. В некоторых вариантах осуществления одна метилфосфонатная связь находится в центральном гэпе полинуклеотида, имеющего гепмерный нуклеозидный мотив.

[00124] В некоторых вариантах осуществления желательно упорядочить количество фосфоротиоатных межнуклеозидных связей и фосфодиэфирных межнуклеозидных связей для поддержания устойчивости к действию нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления желательно упорядочить число и положение фосфоротиоатных межнуклеозидных связей и число и положение фосфодиэфирных межнуклеозидных связей для поддержания устойчивости к действию нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления число фосфоротиоатных межнуклеозидных связей можно уменьшить, а число фосфодиэфирных межнуклеозидных связей можно увеличить. В некоторых вариантах осуществления число фосфоротиоатных межнуклеозидных связей можно уменьшить, а число фосфодиэфирных межнуклеозидных связей можно увеличить, при этом по-прежнему поддерживая устойчивость к действию нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления желательно уменьшить число фосфоротиоатных межнуклеозидных связей, сохраняя при этом устойчивость к действию нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления желательно увеличить число фосфодиэфирных межнуклеозидных связей, при этом сохраняя устойчивость к действию нуклеаз.

[00125] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, нацеленные на нуклеиновую кислоту-мишень, например последовательность, кодирующая белок PSD3, содержат одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь модифицированного полинуклеотида представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь полинуклеотида представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

[00126] В некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар, 2'-О-метоксиэтил, 2'-F или 2'-О-метил.

[00127] В некоторых вариантах осуществления сахарные фрагменты представляют собой небициклические модифицированные сахарные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой бициклические или трициклические сахарные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой имитаторы сахаров. Такие имитаторы сахаров могут содержать одно или несколько замещений, соответствующих замещениям в других типах модифицированных сахарных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой небициклические модифицированные сахарные фрагменты, содержащие фуранозильное кольцо с одним или несколькими ациклическими заместителями, в том числе без ограничения заместителями в 2', 3', 4'-и/или 5'-положениях. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ациклических заместителей в небициклических модифицированных сахарных фрагментах являются разветвленными.

[00128] Нуклеозиды, содержащие модифицированные сахарные фрагменты, такие как небициклические модифицированные сахарные фрагменты, обозначают по положению(положениям) замещения(замещений) в сахарном фрагменте нуклеозида. Например, нуклеозиды, содержащие 2'-замещенные или 2-модифицированные сахарные фрагменты, называют 2'-замещенными нуклеозидами или 2-модифицированными нуклеозидами. Примеры 2'-замещающих групп, подходящих для небициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают без ограничения 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" или "О-метил") и 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE"). В некоторых вариантах осуществления 2'-замещающие группы выбраны из галогена, аллила, amino, азидо, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-C₁-C₁₀алкокси, замещенного O-C₁-C₁₀алкокси, O-C₁-C₁₀алкила, замещенного O-C₁-C₁₀алкила, S-алкила, N(R_m)-алкила, O-алкенила, S-алкенила, N(R_m)-алкенила, O-алкинила, S-алкинила, N(R_m)-алкинила, O-алкиленил-O-алкила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила, O-аралкила, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) или OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, защитную группу для аминогруппы или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀алкил, -

$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ ("DMAOE"), $2'-OCH_2OCH_2N(CH_2)_2$ ("DMAEOE"), и 2'-замещающих групп, описанных в Cook et al., U.S. 6531584, Cook et al., U.S. 5859221, и Cook et al., U.S. 6005087. В некоторых вариантах осуществления данные 2'-замещающие группы могут быть дополнительно замещены одной или несколькими замещающими группами, независимо выбранными из гидроксила, амина, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро (NO_2), тиола, тиоалкокси, тиоалкила, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила. В некоторых вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из F, NH_2 , N_3 , OCF_3 , OCH_3 , $O(CH_2)_3NH_2$, $CH_2CH=CH_2$, $OCH_2CH=CH_2$, $OCH_2CH_2OCH_3$, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2ON(R_m)(R_n)$, $O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$ и N-замещенного ацетамида ($OCH_2C(=O)-N(R_m)(R_n)$), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, защитную группу для аминогруппы или замещенный или незамещенный C1-C10алкил.

[00129] В некоторых вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из F, OCF_3 , OCH_3 , $OCH_2CH_2OCH_3$, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, $O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$ и $OCH_2C(=O)-N(H)CH_3$ ("NMA"). В некоторых вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из F, OCH_3 и $OCH_2CH_2OCH_3$.

[00130] В определенных вариантах осуществления небициклические модифицированные сахарные фрагменты содержат замещающую группу в 4'-положении. Примеры подходящих 4'-замещающих групп включают без ограничения алкокси (например, метокси), алкил и группы, описанные в Manoharan et al., WO 2015/106128. В определенных вариантах осуществления небициклические модифицированные сахарные фрагменты содержат замещающую группу в 3'-положении. Примеры замещающих групп, подходящих для 3'-положения модифицированных сахарных фрагментов, включают без ограничения алкокси (например, метокси), алкил (например, метил, этил). В определенных вариантах осуществления небициклические модифицированные сахарные фрагменты содержат замещающую группу в 5'-положении. Примеры замещающих групп, подходящих для 5'-положения модифицированных сахарных фрагментов, включают без ограничения алкил

(например, метил (R или S), винил и 5'-алкокси (например, метокси). В некоторых вариантах осуществления небиициклические модифицированные сахара содержат более одного немостикового заместителя в сахаре, например, в случае с 2'-F-5'-метил-модифицированными сахарными фрагментами, а также модифицированными сахарными фрагментами и модифицированными нуклеозидами, описанными в *Migawa et al.*, WO 2008/101157 и *Rajeev et al.*, US2013/0203836.

[00131] Во встречающихся в природе нуклеиновых кислотах сахара связаны друг с другом с помощью связи 3' с 5'. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидных или сахарных фрагментов, связанных в альтернативном положении, например, в 2'-положении или инвертированном положении 5' с 3'. Например, если связь находится в 2'-положении, 2'-замещающие группы могут вместо этого находиться в 3'-положении.

[00132] Определенные модифицированные сахарные фрагменты содержат мостиковый заместитель в сахаре, который образует второе кольцо, в результате чего образуется бициклический сахарный фрагмент. Нуклеозиды, содержащие такие бициклические сахарные фрагменты, назывались бициклическими нуклеозидами (BNA), заблокированными нуклеозидами или конформационно ограниченными нуклеозидами (CRN). Определенные подобные соединения описаны в публикации патента США № 2013/0190383 и публикации заявки на патент, поданный согласно процедуре РСТ WO 2013/036868. В некоторых подобных вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит мостик между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца. В определенных подобных вариантах осуществления фуранозное кольцо представляет собой рибозное кольцо. Примеры таких 4'-2'-мостиковых заместителей в сахаре включают без ограничения 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2' ("LNA"), 4'-CH₂-S-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' ("ENA"), 4'-CH(CH₃)-O-2' (называемый "затрудненным этилом" или "сEt" в *S*-конфигурации), 4'-CH₂-O-CH₂-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' ("затрудненный МОЕ" или "сМОЕ") и его аналоги (см., например, *Seth et al.*, U.S. 7399845, *Bhat et al.*, U.S. 7569686, *Swayze et al.*, U.S. 7741457 и *Swayze et al.*, U.S. 8022193), 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' и его аналоги (см., например, *Seth et al.*, U.S. 8278283), 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' и его аналоги (см., например, *Prakash et al.*, U.S. 8278425), 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, *Allerson et al.*, U.S. 7696345 и *Allerson et al.*, U.S. 8124745), 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, *Zhou, et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134), 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' и его аналоги (см., например, *Seth et al.*, U.S. 8278426),

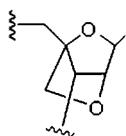
4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2', 4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' и 4'-CH₂-N(R)-O-2', где каждый R, R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂алкил (см., например, Imanishi et al., U.S. 7,427,672).

[00133] В некоторых вариантах осуществления такие 4'-2'-мостики независимо содержат от 1 до 4 связанных групп, независимо выбранных из -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x- и -N(R_a)-; где x составляет 0, 1 или 2; n составляет 1, 2, 3 или 4; каждый R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C₁-C₁₂алкил, замещенный C₁-C₁₂алкил, C₂-C₁₂алкенил, замещенный C₂-C₁₂алкенил, C₂-C₁₂алкинил, замещенный C₂-C₁₂алкинил, C₅-C₂₀арил, замещенный C₅-C₂₀арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C₅-C₇алициклический радикал, замещенный C₅-C₇алициклический радикал, галоген, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)₂-J₁) или сульфоксил (S(=O)-J₁), и каждый J₁ и J₂ независимо представляет собой H, C₁-C₁₂алкил, замещенный C₁-C₁₂алкил, C₂-C₁₂алкенил, замещенный C₂-C₁₂алкенил, C₂-C₁₂алкинил, замещенный C₂-C₁₂алкинил, C₅-C₂₀арил, замещенный C₅-C₂₀арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C₁-C₁₂аминоалкил, замещенный C₁-C₁₂аминоалкил или защитную группу.

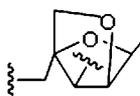
[00134] Дополнительные бициклические сахарные фрагменты известны из уровня техники, см., например: Freier et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek et al., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740, Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 20017, 129, 8362-8379; Elayadi et al., *Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum 10 et al., *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; Wengel et al., U.S. 7,053,207, Imanishi et al., U.S. 6,268,490, Imanishi et al., U.S. 6,770,748, Imanishi et al., U.S. RE44,779; Wengel et al., U.S. 6,794,499, Wengel et al., U.S. 6,670,461; Wengel et al., U.S. 7,034,133, Wengel et al., U.S. 8,080,644; Wengel et al., U.S. 8,034,909; Wengel et al., U.S. 8,153,365; Wengel et al., U.S. 7,572,582; and Ramasamy et al., U.S. 6,525,191, Torsten et al., WO 2004/106356, Wengel et al., WO 91999/014226; Seth et al., WO 2007/134181; Seth et al., U.S. 7,547,684; Seth et al., U.S. 7,666,854; Seth et al., U.S. 8,088,746; Seth et al., U.S.

7,750,131; Seth et al., U.S. 8,030,467; Seth et al., U.S. 8,268,980; Seth et al., U.S. 8,546,556; Seth et al., U.S. 8,530,640; Migawa et al., U.S. 9,012,421; Seth et al., U.S. 8,501,805; and U.S. Patent Publication Nos. Allerson et al., US2008/0039618 and Migawa et al., US2015/0191727.

[00135] В некоторых вариантах осуществления бициклические сахарные фрагменты и нуклеозиды, в состав которых включены такие бициклические сахарные фрагменты, дополнительно определяются изомерной конфигурацией. Например, нуклеозид LNA (описанный в данном документе) может быть представлен в конфигурации α -L или в конфигурации β -D.



Bx

LNA (β -D-конфигурация)мостик = 4'-CH₂-O-2'

Bx

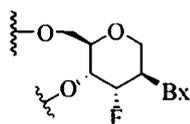
 α -L-LNA (α -L-конфигурация)мостик = 4'-CH₂-O-2'

α -L-Метиленокси (4'-CH₂-O-2') или имеющие конфигурацию α -L-LNA бициклические нуклеозиды были включены в полинуклеотиды, которые демонстрировали антисмысловую активность (Frieden et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372). Было показано, что добавление заблокированных нуклеиновых кислот к siRNA увеличивает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mal Cane Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). В данном документе общее описание бициклических нуклеозидов включает обе изомерные конфигурации. Если положения конкретных бициклических нуклеозидов (например, LNA или cEt) идентифицированы в вариантах осуществления, проиллюстрированных в данном документе на примерах, то они представлены в конфигурации β -D, если не указано иное.

[00136] В некоторых вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты содержат один или несколько немостиковых заместителей в сахаре и один или несколько мостиковых заместителей в сахаре (например, в случае с 5'-замещенными и содержащими 4'-2'-мостик сахарами). В некоторых вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой имитаторы сахаров. В некоторых подобных вариантах осуществления атом кислорода в сахарном фрагменте заменен, например, атомом серы, углерода или азота. В некоторых подобных вариантах осуществления такие модифицированные сахарные фрагменты также содержат

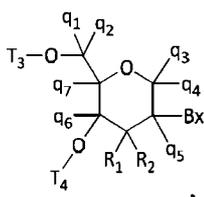
мостиковые и/или немостиковые заместители, описанные в данном документе. Например, определенные имитаторы сахаров содержат 4'-атом серы и замещение в 2'-положении (см., например, Bhat et al., U.S. 7875733, и Bhat et al., U.S. 7939677) и/или в 5'-положении.

[00137] В некоторых вариантах осуществления имитаторы сахаров содержат кольца с числом атомов, отличным от 5. Например, в некоторых вариантах осуществления имитатор сахара содержит шестичленный тетрагидропиран ("ТНР"). Такие тетрагидропираны могут быть дополнительно модифицированными или замещенными. Нуклеозиды, содержащие такие модифицированные тетрагидропираны, включают без ограничения гексит-нуклеиновую кислоту ("HNA"), аннит-нуклеиновую кислоту ("ANA"), маннит-нуклеиновую кислоту ("MNA") (см., например, Leumann, *CJ. Bioorg. & Med. Chem.* 2002, 10, 841-854), фтор-ННА:



F-HNA ,

("F-HNA", см., например, Swayze et al., U.S. 8088904, Swayze et al., U.S. 8440803; Swayze et al., U.S.; и Swayze et al., U.S. 9005906), при этом F-HNA также может обозначаться как F-ТНР или 3'-фтортетрагидропиран, и нуклеозиды, содержащие дополнительные модифицированные соединения ТНР, характеризующиеся следующей формулой:

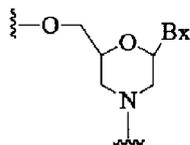


где независимо для каждого указанного модифицированного ТНР-нуклеозида: Вх представляет собой фрагмент нуклеотидного основания; Т₃ и Т₄ независимо представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный ТНР-нуклеозид с остальной частью полинуклеотида, или один из Т₃ и Т₄ представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный ТНР-нуклеозид с остальной частью полинуклеотида, а другой из Т₃ и Т₄ представляет собой H, защитную группу для гидроксильной группы, связанную конъюгированную группу или 5'- или 3'-концевую группу; каждый из q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆

и q_7 независимо представляет собой H, C₁-С₆алкил, замещенный C₁-С₆алкил, C₂-С₆алкенил, замещенный C₂-С₆алкенил, C₂-С₆алкинил или замещенный C₂-С₆алкинил, и каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из водорода, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ и CN, где X представляет собой O, S или NJ₁, и каждый J₁, J₂ и J₃ независимо представляет собой H или C₁-С₆алкил.

[00138] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модифицированные ТНР-нуклеозиды, где каждый из q_1 , q_2 , q_3 , q_4 , q_5 , q_6 и q_7 представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из q_1 , q_2 , q_3 , q_4 , q_5 , q_6 и q_7 является отличным от H. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из q_1 , q_2 , q_3 , q_4 , q_5 , q_6 и q_7 представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модифицированные ТНР-нуклеозиды, где один из R₁ и R₂ представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления R₁ представляет собой F, а R₂ представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R₁ представляет собой метокси, а R₂ представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R₁ представляет собой метоксиэтокси, а R₂ представляет собой H.

[00139] В некоторых вариантах осуществления имитаторы сахаров содержат кольца, содержащие более 5 атомов и более одного гетероатома. Например, сообщалось о нуклеозидах, содержащих морфолиновые сахарные фрагменты, и об их применении в полинуклеотидах (см., например, Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510, а также Summerton et al., U.S. 5698685; Summerton et al., U.S. 5166315; Summerton et al., U.S. 5185444; и Summerton et al., U.S. 5034506). Применяемый в данном документе термин "морфолиновый компонент" означает имитатор сахара со следующей структурой:

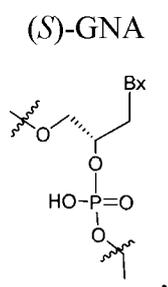


[00140] В некоторых вариантах осуществления морфолиновые компоненты могут быть модифицированы, например, путем добавления или изменения различных замещающих групп в приведенной выше структуре морфолинового компонента. Такие имитаторы сахаров в данном документе называются "модифицированными морфолиновыми компонентами".

[00141] В некоторых вариантах осуществления имитаторы сахаров содержат ациклические фрагменты. Примеры нуклеозидов и полинуклеотидов, например, полинуклеотидов, содержащих такие ациклические имитаторы сахаров, включают без ограничения пептидную нуклеиновую кислоту ("PNA"), ациклическую бутил-нуклеиновую кислоту (см., например, Kumar et al., Org. Biomol. Chem., 2013, 11, 5853-5865), а также нуклеозиды и полинуклеотиды, описанные в Manoharan et al., WO2011/133876. Иллюстративные патенты США, в которых излагается информация о получении соединений на основе PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262. Дополнительные соединения на основе PNA, подходящие для настоящего изобретения, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

[00142] В определенных вариантах осуществления заменители сахара представляют собой "разблокированную" структуру сахара нуклеозидов UNA (разблокированной нуклеиновой кислоты). UNA представляет собой разблокированную ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой удалены любые связи сахара, образуя разблокированный заменитель сахара. Иллюстративные публикации патентов США, в которых излагается информация о получении UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации патентов США № 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

[00143] В определенных вариантах осуществления заменители сахара представляют собой глицерин, обнаруженный в нуклеозидах GNA (гликолевой нуклеиновой кислоты), как показано ниже:



где Bx представляет любое нуклеотидное основание.

[00144] Из уровня техники известны многие другие бициклические и трициклические кольцевые системы сахаров и имитаторов сахаров, которые могут применяться в модифицированных нуклеозидах.

Модифицированные нуклеиновые основания

[00145] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды содержат один или несколько инозиновых нуклеозидов (т. е. нуклеозидов, содержащих гипоксантиновое нуклеотидное основание). Нуклеиновые основания (или основания) с модификациями или замещениями структурно отличаются от встречающихся в природе или синтетических немодифицированных нуклеиновых оснований, но являются функционально взаимозаменяемыми с ними. В образовании водородных связей могут принимать участие как природные, так и модифицированные нуклеиновые основания. Такие модификации нуклеиновых оснований могут придавать антисмысловым соединениям стабильность к действию нуклеаз, сродство связывания или некоторое другое благоприятное биологическое свойство.

[00146] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, содержат модификации, т. е. модифицированный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полинуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидов, содержащих немодифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полинуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полинуклеотиды содержат один или несколько нуклеозидов, которые не содержат нуклеиновое основание, называемых нуклеозидами с удаленными нуклеиновыми основаниями.

[00147] В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые основания выбраны из 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов, алкил или алкинил-замещенных пиримидинов, алкил-замещенных пуринов и N-2-, N-6- и O-6-замещенных пуринов. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые основания выбраны из 2-аминопропиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, 5-метилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-аминоаденина, 6-N-метилгуанина, 6-N-метиладенина, 2-пропиладенина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина и 2-тиоцитозина, 5-пропинил(C≡C-CH₃)-урацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-рибозилурацила (псевдоурацила), 4-тиоурацила, 8-галогена, 8-амино, 8-

тиола, 8-тиоалкила, 8-гидроксила, 8-аза и других 8-замещенных пуринов, 5-галогена, в частности, 5-брома, 5-трифторметила, 5-галогенурацила и 5-галогенцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-Ф-аденина, 2-аминоаденина, 7-дезазагуанина, 7-дезазааденина, 3-дезазагуанина, 3-дезазааденина, 6-N-бензоиладенина, 2-N-изобутирилгуанина, 4-N-бензоилцитозина, 4-N-бензоилурацила, 5-метил-4-N-бензоилцитозина, 5-метил-4-N-бензоилурацила, универсальных оснований, гидрофобных оснований, оснований, обладающих способностью к неспецифическому спариванию, оснований с увеличенным размером и фторированных оснований. Дополнительные модифицированные нуклеиновые основания включают трициклические пиримидины, такие как 1,3-диазафеноксазин-2-он, 1,3-диазафенотиазин-2-он и 9-(2-аминоэтокси)-1,3-диазафеноксазин-2-он (G-образный зажим). Модифицированные нуклеиновые основания также могут включать нуклеиновые основания, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например, 7-дезазааденином, 7-дезазагуанозином, 2-аминопиридином и 2-пиридоном. Дополнительные нуклеиновые основания включают нуклеиновые основания, раскрытые в Merigan et al., U.S. 3687808, нуклеиновые основания, раскрытые в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; и нуклеиновые основания, раскрытые в главах 6 и 15 Antisense Drug Technology, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 и 442-443.

[00148] Публикации, в которых описано получение определенных из вышеупомянутых модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают без ограничения Manoharan et al., US2003/0158403, Manoharan et al., US2003/0175906; Dinh et al., U.S. 4845205; Spielvogel et al., U.S. 5130302; Rogers et al., U.S. 5134066; Bischofberger et al., U.S. 5175273; Urdea et al., U.S. 5367066; Benner et al., U.S. 5432272; Matteucci et al., U.S. 5434257; Gmeiner et al., U.S. 5457187; Cook et al., U.S. 5459255; Froehler et al., U.S. 5484908; Matteucci et al., U.S. 5502177; Hawkins et al., U.S. 5525711; Haralambidis et al., U.S. 5552540; Cook et al., U.S. 5587469; Froehler et al., U.S. 5594121; Switzer et al., U.S. 5596091; Cook et al., U.S. 5614617; Froehler et al., U.S. 5645985; Cook et al., U.S. 5681941; Cook et al., U.S. 5811534; Cook et al., U.S. 5750692; Cook et al.,

U.S. 5948903; Cook et al., U.S. 5587470; Cook et al., U.S. 5457191; Matteucci et al., U.S. 5763588; Froehler et al., U.S. 5830653; Cook et al., U.S. 5808027; Cook et al., 6166199; и Matteucci et al., U.S. 6005096.

[00149] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, нацеленные на нуклеиновую кислоту-мишень, например, последовательность, кодирующая белок PSD3, содержат одно или несколько модифицированных нуклеиновых оснований. В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание полинуклеотида представляет собой 5-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин полинуклеотида представляет собой 5-метилцитозин.

Мотивы из сахаров

[00150] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, предусмотренные в данном документе, содержат один или несколько типов модифицированных сахарных и/или немодифицированных сахарных фрагментов, расположенных вдоль полинуклеотида или его области в виде определенного паттерна или мотива из сахаров. В некоторых вариантах осуществления такие мотивы из сахаров включают без ограничения любые обсуждаемые в данном документе модификации сахаров.

[00151] В некоторых вариантах осуществления модифицированные полинуклеотиды содержат область, имеющую гэмперный мотив, которая содержит две внешние области, или "фланги", и центральную или внутреннюю область, или "гэп", или состоит из нее. Три области гэмперного мотива (5'-фланг, гэп и 3'-фланг) образуют непрерывную последовательность нуклеозидов, где по меньшей мере некоторые сахарные фрагменты нуклеозидов каждого из флангов отличаются от по меньшей мере некоторых сахарных фрагментов нуклеозидов гэпа. В частности, по меньшей мере сахарные фрагменты нуклеозидов каждого фланга, которые располагаются ближе всего к гэпу (нуклеозида 5'-фланга, наиболее близкого к 3'-концу, и нуклеозида 3'-фланга, наиболее близкого к 5'-концу), отличаются от сахарного фрагмента соседних нуклеозидов гэпа, что таким образом определяет границу между флангами и гэпом (т. е. точку сочленения фланга и гэпа). В некоторых вариантах осуществления все сахарные фрагменты в гэпе являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления гэп содержит один или несколько нуклеозидов, имеющих сахарный фрагмент, который отличается от сахарного фрагмента одного или нескольких других нуклеозидов гэпа. В некоторых вариантах осуществления все мотивы из сахаров двух флангов являются

одинаковыми (симметричный гэммер). В некоторых вариантах осуществления мотив из сахаров 5'-фланга отличается от мотива из сахаров 3'-фланга (асимметричный гэммер).

[00152] В некоторых вариантах осуществления фланги гэммера содержат 1-5 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления фланги гэммера содержат 2-5 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления фланги гэммера содержат 3-5 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды гэммера являются модифицированными нуклеозидами.

[00153] В некоторых вариантах осуществления гэм гэммера содержит 7-12 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэм гэммера содержит 7-10 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэм гэммера содержит 8-10 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэм гэммера содержит 10 нуклеозидов. В определенном варианте осуществления каждый нуклеозид гэмпа гэммера является немодифицированным 2'-дезоксинуклеозидом.

[00154] В некоторых вариантах осуществления гэммер является дезоксигэммером. В таких вариантах осуществления нуклеозиды со стороны гэмпа от каждой точки сочленения фланга и гэмпа являются немодифицированными 2'-дезоксинуклеозидами, а нуклеозиды со стороны фланга от каждой точки сочленения фланга и гэмпа являются модифицированными нуклеозидами. В некоторых подобных вариантах осуществления каждый нуклеозид гэмпа является немодифицированным 2'-дезоксинуклеозидом. В некоторых подобных вариантах осуществления каждый нуклеозид каждого фланга является модифицированным нуклеозидом.

[00155] В некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид имеет полностью модифицированный мотив из сахаров, где каждый нуклеозид модифицированного полинуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид содержит область, имеющую полностью модифицированный мотив из сахаров, или состоит из нее, где каждый нуклеозид области содержит модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид содержит область, имеющую полностью модифицированный мотив из сахаров, или состоит из нее, где каждый нуклеозид в полностью модифицированной области содержит одинаковый модифицированный сахарный фрагмент, и такой участок называется в данном документе однородно модифицированным мотивом из сахаров. В некоторых вариантах осуществления полностью модифицированный полинуклеотид является однородно

модифицированным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид однородно модифицированного полинуклеотида содержит одинаковую 2'-модификацию.

Нуклеозидные мотивы

[00156] Нуклеиновые основания (или основания) с модификациями или замещениями структурно отличаются от встречающихся в природе или синтетических немодифицированных нуклеиновых оснований, но являются функционально взаимозаменяемыми с ними. В образовании водородных связей могут принимать участие как природные, так и модифицированные нуклеиновые основания. Такие модификации нуклеиновых оснований могут, например, придавать стабильность к действию нуклеаз, аффинность связывания или некоторые другие полезные биологические свойства полинуклеотидам, предусмотренным в данном документе, например, полинуклеотидам по настоящему изобретению.

[00157] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, предусмотренные в данном документе, содержат модифицированные и/или немодифицированные нуклеиновые основания, расположенные вдоль полинуклеотида или его области в виде определенного паттерна или мотива. В некоторых вариантах осуществления каждое нуклеиновое основание является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления ни одно из нуклеиновых оснований не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления каждый пурин или каждый пиримидин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления каждый аденин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления каждый гуанин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления каждый тимин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления каждый урацил является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления некоторые или все цитозинового нуклеиновые основания в модифицированном полинуклеотиде представляют собой 5-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления модифицированные полинуклеотиды содержат блок из модифицированных нуклеиновых оснований. В некоторых подобных вариантах осуществления блок расположен на 3'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления блок расположен в пределах 3 нуклеозидов на 3'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления блок расположен на 5'-конце полинуклеотида. В некоторых

вариантах осуществления блок расположен в пределах 3 нуклеозидов на 5'-конце полинуклеотида.

[00158] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, имеющие гэммерный мотив, содержат нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления один нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание, находится в центральном гэпе полинуклеотида, имеющего гэммерный мотив. В некоторых вариантах осуществления сахарный фрагмент указанного нуклеозида представляет собой 2'-дезоксирибозильный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание выбрано из 2-тиопиримидина и 5-пропинпиримидина.

[00159] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, предусмотренные в данном документе, содержат модифицированные и/или немодифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль полинуклеотида или его области в виде определенного паттерна или мотива. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа по сути представляет собой фосфатную межнуклеозидную связь (P=O). В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного полинуклеотида представляет собой фосфоротиоат (P=S). В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного полинуклеотида независимо выбрана из фосфоротиоатной и фосфатной межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления мотив из сахаров модифицированного полинуклеотида представляет собой гэммер, а все межнуклеозидные связи в гэпе являются модифицированными. В некоторых подобных вариантах осуществления некоторые или все межнуклеозидные связи во флангах являются немодифицированными фосфатными связями. В некоторых вариантах осуществления концевые межнуклеозидные связи являются модифицированными.

Модифицированные полинуклеотиды

[00160] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из вышеприведенных модификаций (например, сахаров, нуклеиновых оснований, межнуклеозидных связей) включены в состав модифицированного полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид характеризуется по его модификации, мотивам и значению общей длины. В некоторых вариантах осуществления каждый из таких параметров является независимым от других.

Таким образом, если не указано иное, каждая межнуклеозидная связь полинуклеотида, имеющего гѣпмерный мотив из сахаров, может быть модифицированной или немодифицированной и может соответствовать или не соответствовать гѣпмерному паттерну модификаций сахаров. Например, межнуклеозидные связи во фланговых областях гѣпмера из сахаров могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга и могут быть такими же, как межнуклеозидные связи в области гѣпа мотива из сахаров, или отличными от них. Аналогичным образом, такие гѣпмерные полинуклеотиды могут содержать одно или несколько модифицированных нуклеиновых оснований независимо от гѣпмерного паттерна модификаций сахаров. Кроме того, в определенных случаях полинуклеотид описывается общей длиной, или диапазоном длин, или длинами или диапазонами длин двух или более областей (например, область из нуклеозидов, имеющих указанные модификации сахаров). В таких вариантах осуществления может быть возможным выбрать для каждого диапазона такие численные показатели, которые в результате обеспечивают полинуклеотид, имеющий общую длину, выходящую за пределы указанного диапазона. В таких вариантах осуществления должны быть удовлетворены требования к обоим элементам. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид состоит из 15-20 связанных нуклеозидов и имеет мотив из сахаров, состоящий из трех областей А, В и С, где область А состоит из 2-6 связанных нуклеозидов, имеющих указанный мотив из сахаров, область В состоит из 6-10 связанных нуклеозидов, имеющих указанный мотив из сахаров, и область С состоит из 2-6 связанных нуклеозидов, имеющих указанный мотив из сахаров.

[00161] В некоторых вариантах осуществления соединения, предусмотренные в данном документе, содержат полинуклеотид (модифицированный или немодифицированный) и необязательно одну или несколько конъюгированных групп и/или концевых групп или состоят из них. Конъюгированные группы состоят из одного или нескольких фрагментов конъюгата и конъюгирующего линкера, который связывает фрагмент конъюгата с полинуклеотидом. Конъюгированные группы могут быть присоединены к любому одному или обоим концам полинуклеотида и/или в любом внутреннем положении. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные группы присоединены к нуклеозиду модифицированного полинуклеотида в 2'-положении. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные группы, присоединенные к любому одному или обоим концам полинуклеотида, являются концевыми группами. В определенных подобных вариантах осуществления

конъюгированные группы или концевые группы присоединены на 3'- и/или 5'-конце полинуклеотида. В определенных подобных вариантах осуществления конъюгированные группы (или концевые группы) присоединены на 3'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные группы присоединены возле 3'-конца полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные группы (или концевые группы) присоединены на 5'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления конъюгированные группы присоединены возле 5'-конца полинуклеотида.

[00162] В некоторых вариантах осуществления конъюгированная/концевая группа полинуклеотида содержит кэп-группу, фосфатный фрагмент, защитную группу и модифицированный или немодифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления конъюгированная/концевая группа включает интеркалятор, репортер, полиамин, полиамид, пептид, углевод (например, GalNAc), витамин, полиэтиленгликоль, тиоэфир, полиэфир, фолат, липид, фосфолипид, биотин, феназин, фенантридин, антрахинон, адамантан, акридин, флуоресцеин, родамин, кумарин, флуорофор и краситель.

[00163] В некоторых вариантах осуществления конъюгированная/концевая группа полинуклеотида содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент расположен на 5'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент расположен на 3'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент нацеливает полинуклеотид в конкретное субклеточное расположение и/или в конкретный тип клетки или ткани. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит лиганд для рецептора. В некоторых вариантах осуществления рецептор является специфическим в отношении определенного типа клеток и/или тканей. В некоторых вариантах осуществления распознавание нацеливающего фрагмента (например, лиганда) рецептором опосредует эндоцитоз полинуклеотида, конъюгированного с нацеливающим фрагментом.

[00164] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент нацелен на клетку печени (также называемый в данном документе гепатоцитом). В некоторых вариантах осуществления клетка печени представляет собой клетку печени человека. В некоторых вариантах осуществления клетка печени экспрессирует рецептор асиалогликопротеина (ASGPr) на своей клеточной поверхности. В некоторых вариантах

осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой лиганд для ASGPr. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит фрагмент N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит от 1 до 5 фрагментов GalNAc. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фрагментов GalNAc. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит 3 фрагмента GalNAc. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит 3 фрагмента GalNAc в трехантенном расположении (трехантенный GalNAc). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит трехантенный GalNAc на 5'-конце полинуклеотида.

[00165] В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды содержат стабилизированную фосфатную группу на 5'-конце. В некоторых подобных вариантах осуществления соединение представляет собой соединение на основе ssRNAi или соединение представляет собой siRNA, а полинуклеотид, содержащий стабилизированную фосфатную группу, представляет собой антисмысловую нить соединения на основе siRNA. 5'-Концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфородитиоат (5'-PS₂), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат (MePhos) или 5'-дезоксид-5'-С-малонил. Когда 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат, 5'-VP может быть 5'-E-VP-изомером (т. е. транс-винилфосфатом), 5'-Z-VP-изомером (т. е. цис-винилфосфатом) или их смесью. Хотя такая фосфатная группа может быть присоединена либо к антисмысловому полинуклеотиду RNAi, либо к антисмысловому полинуклеотиду RNAi, как правило, она будет присоединена к антисмысловому полинуклеотиду RNAi, поскольку было показано, что это улучшает активность определенных соединений на основе RNAi. См., например, Prakash *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 43(6):2993-3011, 2015; Elkayam, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 45(6):3528-3536, 2017; Parmar, *et al.* *ChemBioChem*, 17(11):985-989; 2016; Harastzi, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 45(13):7581-7592, 2017. В определенных вариантах осуществления стабилизирующая фосфат группа представляет собой 5'-циклопропилфосфонат. См., например, WO/2018/027106.

[00166] В определенных вариантах осуществления полинуклеотид комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени по всей длине полинуклеотида. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды являются комплементарными

на 99%, 95%, 90%, 85% или 80% в отношении нуклеиновой кислоты-мишени. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды являются комплементарными на по меньшей мере 80% в отношении нуклеиновой кислоты-мишени по всей длине полинуклеотида и содержат область, которая на 100% или полностью комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления область полной комплементарности имеет длину от 6 до 20, от 10 до 18 или от 18 до 20 нуклеиновых оснований.

[00167] В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды содержат нацеливающую область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления нацеливающая область содержит или состоит из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 25 смежных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нацеливающая область составляет 70%, 80%, 85%, 90%, 95% нуклеозидов полинуклеотида. В определенных вариантах осуществления нацеливающая область составляет все нуклеозиды полинуклеотида. В определенных вариантах осуществления нацеливающая область полинуклеотида менее чем на 99%, 95%, 90%, 85% или 80% комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления нацеливающая область полинуклеотида на 100% комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени.

[00168] В определенных вариантах осуществления соединения на основе RNAi содержат смысловой полинуклеотид RNAi. В таких вариантах осуществления смысловой полинуклеотид RNAi содержит антисмысловую область гибридизации, комплементарную антисмысловому полинуклеотиду RNAi. В определенных вариантах осуществления антисмысловая область гибридизации содержит или состоит из по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 25 смежных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления антисмысловая область гибридизации составляет 70%, 80%,

85%, 90%, 95% нуклеозидов смыслового полинуклеотида RNAi. В определенных вариантах осуществления антисмысловая область гибридизации составляет все нуклеозиды смыслового полинуклеотида RNAi. В определенных вариантах осуществления антисмысловая область гибридизации смыслового полинуклеотида RNAi является на по меньшей мере 99%, 95%, 90%, 85% или 80% комплементарной антисмысловому полинуклеотиду RNAi. В определенных вариантах осуществления антисмысловая область гибридизации смыслового олигонуклеотида RNAi является на 100% комплементарной антисмысловому полинуклеотиду RNAi.

[00169] Гибридирующая область смыслового полинуклеотида RNAi гибридизуется с антисмысловым полинуклеотидом RNAi с образованием области дуплекса. В определенных вариантах осуществления такая область дуплекса состоит из 7 гибридизованных пар нуклеозидов (одна из каждой пары находится на антисмысловом полинуклеотиде RNAi, а другая из каждой пары находится на смысловом полинуклеотиде RNAi). В определенных вариантах осуществления область дуплекса содержит по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 25 гибридизованных пар. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид антисмыслового полинуклеотида RNAi спарен в области дуплекса (т. е. антисмысловой полинуклеотид RNAi не имеет нуклеозидов выступающих концов). В определенных вариантах осуществления антисмысловой полинуклеотид RNAi содержит неспаренные нуклеозиды на 3'-конце и/или 5'-конце (нуклеозиды выступающих концов). В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид смыслового полинуклеотида RNAi спарен в области дуплекса (т. е. смысловой полинуклеотид RNAi не имеет нуклеозидов выступающих концов). В определенных вариантах осуществления смысловой полинуклеотид RNAi содержит неспаренные нуклеозиды на 3'-конце и/или 5'-конце (нуклеозиды выступающих концов). В определенных вариантах осуществления дуплексы, образованные антисмысловым полинуклеотидом RNAi и смысловым полинуклеотидом RNAi, не содержат выступающих концов на одном или обоих концах. Такие концы без выступов называются тупыми. В определенных вариантах осуществления, где антисмысловой полинуклеотид RNAi имеет нуклеозиды выступающих концов, один или

несколько из этих нуклеозидов выступающих концов комплементарны нуклеиновой кислоте-мишени. В определенных вариантах осуществления, где полинуклеотид антисмысловой RNAi имеет нуклеозиды выступающих концов, один или несколько из этих нуклеозидов выступающих концов не комплементарны нуклеиновой кислоте-мишени.

Дополнительные соединения

[00170] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению для лечения или предупреждения жировой болезни печени у субъекта, нуждающегося в этом, или обеспечения понижения уровня экспрессии PSD3 содержит siRNA. "Короткая интерферирующая РНК", "малая интерферирующая РНК", "РНК для сайленсинга" или "siRNA" представляют собой класс соединений, включающих полинуклеотиды комплементарной РНК, гибридизованные друг с другом, каждый из которых содержит приблизительно от 15 до приблизительно 30 связанных нуклеозидов. siРНК функционирует *in vivo* в рамках пути РНК-интерференции (RNAi) и действует, по меньшей мере частично, с помощью RISC или Ago2, препятствуя экспрессии специфических генов с комплементарными нуклеотидными последовательностями путем деградации мРНК после транскрипции, тем самым предотвращая трансляцию. См., напр., Dana et al., Int J Biomed Sci 13(2), 48-57 (2017), Whitehead et al., Ann Rev Chem Biomol Eng 2, 77-96 (2011), Filipowicz et al., Curr Opin Struct Biol 15, 331-341, (2005).

[00171] В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой siRNA, способную гибридизоваться с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок PSD3, и способную подавлять экспрессию белка PSD3. В некоторых вариантах осуществления siRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% комплементарна участку последовательности нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей белок PSD3. В некоторых вариантах осуществления siRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая на 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%, по меньшей мере 99% или приблизительно 100% комплементарна участку последовательности равной длины, кодирующей белок PSD3. В некоторых вариантах осуществления siRNA

содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 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%, по меньшей мере 99% или приблизительно 100% комплементарна участку равной длины любой из последовательности под SEQ ID NO: 2-18.

[00172] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению для лечения или предупреждения жировой болезни печени у субъекта, нуждающегося в этом, или обеспечения понижения уровня экспрессии PSD3 содержит miRNA. "microRNA" или "miRNA" представляет собой однонитевой РНК-полинуклеотид длиной приблизительно от 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, который функционирует *in vivo* при сайленсинге РНК и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. miRNA функционирует посредством спаривания оснований с последовательностями, комплементарными мРНК. В результате спаривания оснований miRNA мРНК "подвергается сайленсингу" посредством одного или нескольких из следующих процессов: (1) расщепления цепи мРНК на две части; (2) дестабилизации мРНК за счет укорочения ее поли(А)-хвоста и (3) менее эффективной трансляции мРНК. miRNA сходны с siRNA, описанными в данном документе, за исключением того, что miRNA обычно происходит из областей РНК, которые складываются друг с другом с образованием шпильчатых структур, тогда как siRNA происходит из более длинных областей двухнитевой РНК. См., напр., Filipowicz et al., *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-341, (2005), van Rooij et al., *J Clin Invest* 117, 2369-2376 (2007) и MacFarlane et al., *Curr Genomics* 11(7), 537-561 (2010).

[00173] В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой miRNA, способную гибридизоваться с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок PSD3, и способную подавлять экспрессию белка PSD3. В некоторых вариантах осуществления miRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% комплементарна участку последовательности нуклеиновой кислоты равной длины, кодирующей белок PSD3. В

некоторых вариантах осуществления miRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая на 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%, по меньшей мере 99% или приблизительно 100% комплементарна участку последовательности равной длины, кодирующей белок PSD3. В некоторых вариантах осуществления miRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 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%, по меньшей мере 99% или приблизительно 100% комплементарна участку равной длины любой из последовательности под SEQ ID NO: 2-18.

Клетки и субъекты

[00174] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению вводят в клетку и/или ткань. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят в клетку и/или ткань *in vitro*, например, в планшет для культивирования клеток или тканей. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку печени, т. е. гепатоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой гепатоцит человека, гепатоцит животного или непаренхиматозную клетку.

[00175] В некоторых вариантах осуществления соединения вводят в клетку и/или ткань *in vivo*, например, субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом-человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом-животным. В некоторых вариантах осуществления животное является животной моделью, например, моделью заболевания. Например, субъектом может быть человек, крыса, собака, мышь, обезьяна, кошка или кролик.

Заболевания и состояния

[00176] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется жировая болезнь печени или он подвержен риску ее развития. NAFLD определяется по наличию накопления жира в печени, превышающее 5% по весу, при отсутствии значительного

употребления алкоголя, приема стеатогенного лекарственного препарата или наследственного заболевания (Kotronen et al, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2008, 28: 27-38). NAFLD охватывает целый спектр заболеваний печени от жировой дегенерации до неалкогольного стеатогепатита (NASH) и цирроза. Неалкогольный стеатогепатит (NASH) представляет собой NAFLD с наличием признаков воспаления и повреждения печени. Гистологически NASH определяется по наличию макровезикулярного стеатоза, гепатоцеллюлярного баллонирования и лобулярных воспалительных инфильтратов (Sanyal, *Hepatol. Res.* 2011. 41: 670-4). По оценкам NASH затрагивает 2-3% общей численности населения. При наличии других патологий, таких как ожирение или диабет, прогнозируемая частота встречаемости возрастает до 7% и 62% соответственно (Hashimoto et al, *J. Gastroenterol.* 2011. 46(1): 63-69).

[00177] Жировая болезнь печени может предусматривать увеличение одного или нескольких из содержания внутриклеточного жира, веса печени, содержания триглицеридов в печени, циркулирующей в плазме крови аланинаминотрансферазы (ALT), коллагена печени 1a1 и содержания липидов. Лечение жировой болезни печени может быть дополнительно осложнено из-за лекарственных средств для лечения жировой болезни печени, например, лекарственных средств против NASH, которые в клинической разработке вызывают повышение холестерина, в частности LDL-холестерина, который является известным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

[00178] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения или предупреждения жировой болезни печени у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3 у субъекта, например, полинуклеотид, предусмотренный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта по настоящему изобретению, нуждающегося в лечении или предупреждении жировой болезни печени, имеется одно или несколько из неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH) (цирротического и нецирротического NASH), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) и/или фиброза печени. В некоторых вариантах осуществления у субъекта по настоящему изобретению, нуждающегося в лечении или предупреждении жировой болезни печени, имеется алкогольная жировая болезнь печени (AFLD) или алкогольный стеатогепатит (ASH) (цирротический и нецирротический

ASH). В некоторых вариантах осуществления у субъекта по настоящему изобретению, нуждающегося в лечении или предупреждении жировой болезни печени, имеется повреждение печени, стеатоз, фиброз печени, воспаление печени, рубцевание или цирроз печени, печеночная недостаточность у субъекта.

[00179] В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает уменьшение одного или нескольких из содержания внутриклеточного жира, массы печени, содержания триглицеридов в печени, циркулирующей в плазме крови аланинаминотрансферазы (ALT), коллагена печени 1a1 и содержания липидов у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество холестерина и/или LDL у субъекта уменьшается после введения соединения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта по настоящему изобретению, нуждающегося в лечении или предупреждении жировой болезни печени, имеется сердечно-сосудистое заболевание, такое как дислипидемия. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой смешанную дислипидемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой гиперхолестеринемию. В определенных вариантах осуществления заболевание представляет собой семейную гиперхолестеринемию.

[00180] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения содержания внутриклеточного жира в клетке печени у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии (PSD3) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой полинуклеотид, предусмотренный в данном документе.

[00181] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения понижения уровня холестерина у субъекта, при этом способ включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой полинуклеотид, предусмотренный в данном документе.

[00182] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, корреляция между PSD3 и жировой болезнью печени может быть связана с активацией PSD3 фактора ADP-рибозилирования 6 (ARF6). Полагают, что PSD3 взаимодействует с ARF6 и активирует его, катализируя превращение ARF6-GDP в ARF-GTP. ARF6 участвует во

внутриклеточном транспорте везикул и обладает гомологией с ARF1, который участвует в формировании липидных капель, и, таким образом, ARF6 может вносить вклад в содержание жира в печени, влияя на транспорт и образование липидных капель. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения снижения активации фактора ADP-рибозилирования 6 (ARF6), при этом способ включает понижение уровня экспрессии PSD3 у субъекта, включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии (PSD3) у субъекта, где более низкий уровень экспрессии PSD3 обеспечивает сниженную активацию ARF6.

Идентификация и лечение субпопуляции

[00183] В некоторых вариантах осуществления субъект по настоящему изобретению, подлежащий лечению жировой болезни печени, не имеет аллельного варианта 186T белка PSD3. Как описано в настоящем документе, PSD3 был обнаружен в качестве потенциальной мишени для лечения или предупреждения жировой болезни печени благодаря новой идентификации варианта L186T PSD3 у определенных индивидуумов, что привело к понижению частоты жировой болезни печени и понижению уровней холестерина и LDL-холестерина. Описанные в данном документе результаты демонстрируют, что этот генетический вариант представляет собой мутацию с потерей функции, которая снижает активность белка PSD3 в отношении обмена гуанина. Описанные в данном документе результаты также демонстрируют, что наличие аллеля 186L вызывает заболевание печени. Таким образом, описанные в данном документе данные позволяют предположить, что отрицательная регуляция PSD3 может обеспечивать защиту от NAFLD.

[00184] Аллельные варианты PSD3 (т. е. 186T и 186L) могут обеспечить применимый способ различения субпопуляции субъектов с жировой болезнью печени, подходящих для терапии, обеспечивающей снижение уровня PSD3. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ идентификации субпопуляции субъектов с жировой болезнью печени, подходящей для терапии, обеспечивающей снижение уровня PSD3, при этом способ включает: (a) диагностику наличия у субъекта жировой болезни печени и (b) определение того, имеет ли субъект аллельный вариант 186T белка PSD3 или аллельный вариант 186L белка PSD3; где, если субъект имеет аллельный вариант 186L белка PSD3, то подходящее лечение включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в

отношении понижения уровня экспрессии PSD3 и где, если субъект имеет аллельный вариант 186T PSD3, то лечение не включает введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии снижения уровня экспрессии PSD3, что не подходит. В некоторых вариантах осуществления стадия (b) может быть определена путем генотипирования аллельного варианта 186L или путем вывода из генотипирования генетического варианта в сильном неравновесном сцеплении с аллельным вариантом 186L.

[00185] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ лечения субъекта с жировой болезнью печени, при этом способ включает: (a) определение того, имеет ли субъект аллельный вариант 186T белка PSD3 или аллельный вариант 186L белка PSD3, и (b) введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3, только если субъект имеет аллельный вариант 186L PSD3. В некоторых вариантах осуществления стадия (a) может быть определена путем генотипирования аллельного варианта 186L или путем вывода из генотипирования генетического варианта в сильном неравновесном сцеплении с аллельным вариантом 186L.

Предупреждение

[00186] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения или предупреждения жировой болезни печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии *белка 3, содержащего домен плекстрина и Sec7* (PSD3), у субъекта. Термин "предупреждение" или "предупреждать", применяемый в данном документе, предназначен для статистического улучшения вероятности того, что субъект имеет более высокий риск развития жировой болезни печени. Таким образом, введение соединения, эффективного в отношении понижения уровня экспрессии PSD3, может быть обеспечено субъекту до начала развития жировой болезни печени. В некоторых вариантах осуществления субъект с более высоким риском развития жировой болезни печени имеет аллельный вариант 186L белка PSD3. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на предупреждение жировой болезни печени у субъекта, имеющего аллельный вариант 186L PSD3, включающее введение субъекту соединения, содержащего полинуклеотид, эффективный в отношении понижения уровня экспрессии PSD3.

[00187] Все ссылки, цитируемые в данном документе, в том числе патенты, заявки на патенты, статьи, учебники и т. п., и ссылки, цитируемые в данном документе, до той степени, в которой они уже не являются таковыми, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неограничивающее раскрытие и включение посредством ссылки

[00188] Хотя некоторые соединения, композиции и способы, описанные в данном документе, были конкретно описаны в соответствии с определенными вариантами осуществления, нижеследующие примеры служат только для иллюстрации соединений, описанных в данном документе, и не подразумевают их ограничение. Каждый из литературных источников, номера доступа в GenBank и т. п., указанный в настоящей заявке, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00189] Несмотря на то, что в перечне последовательностей, прилагаемом к данной подаваемой заявке, каждая последовательность в соответствии с установленными требованиями идентифицирована как "РНК" либо как "ДНК", в действительности эти последовательности могут быть модифицированы с помощью любой комбинации химических модификаций. Специалист в данной области техники легко поймет, что такое обозначение, как "РНК" или "ДНК", для описания модифицированных олигонуклеотидов в определенных случаях является произвольным. Например, полинуклеотид, содержащий нуклеозид, содержащий 2'-ОН-сахарный фрагмент и тиминовое основание, может быть описан как ДНК, имеющая модифицированный сахар (2'-ОН на месте одного 2'-Н в ДНК), или как РНК, имеющая модифицированное основание (тимин (метилованный урацил) на месте урацила в РНК). Соответственно, подразумевается, что последовательности нуклеиновых кислот, предусмотренные в данном документе, в том числе без ограничения приведенные в перечне последовательностей, охватывают нуклеиновые кислоты, содержащие любую комбинацию из природных или модифицированных РНК и/или ДНК, в том числе без ограничения такие нуклеиновые кислоты с модифицированными нуклеиновыми основаниями. В качестве дополнительного примера и без ограничения, полинуклеотид, который имеет последовательность нуклеиновых оснований "ATCGATCG", охватывает любые соединения, имеющие такую последовательность нуклеиновых оснований, независимо от того, являются ли они модифицированными или немодифицированными, в том числе без ограничения такие соединения, которые содержат основания РНК, такие как соединения, имеющие последовательность "AUCGAUCG", и соединения, имеющие

несколько оснований ДНК и несколько оснований РНК, такие как "AUCGATCG", а также соединения, имеющие другие модифицированные нуклеиновые основания, такие как "AT^mCGAUCG," где ^mC указывает на цитозиновое основание, содержащее метильную группу в 5-положении.

[00190] Некоторые соединения, описанные в данном документе (например, модифицированные олигонуклеотиды), имеют один или несколько асимметричных центров и поэтому образуют энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные конфигурации, которые могут быть определены с точки зрения абсолютной стереохимии как (*R*) или (*S*), как α или β , как например в случае аномеров сахаров, или как (*D*) или (*L*), как например в случае аминокислот и т. п. Соединения, представленные в данном документе, которые изображены или описаны как имеющие определенные стереоизомерные конфигурации, включают только указанные соединения. Представленные в данном документе соединения, которые изображены или описаны как имеющие неопределенную стереохимию, включают все такие возможные изомеры, в том числе их стереослучайные и оптически чистые формы, если не указано иное. Подобным образом также включены в данном документе все таутомерные формы соединений, если не указано иное. Если не указано иное, подразумевается, что соединения, описанные в данном документе, включают соответствующие солевые формы.

[00191] Соединения, описанные в данном документе, включают в себя варианты, в которых один или несколько атомов заменены нерадиоактивным изотопом или радиоактивным изотопом указанного элемента. Например, соединения согласно данному документу, которые содержат атомы водорода, охватывают все возможные замещения дейтерием каждого из атомов водорода ¹H. Изотопные замещения, охватываемые соединениями согласно данному документу, включают без ограничения: ²H или ³H вместо ¹H, ¹³C или ¹⁴C вместо ¹²C, ¹⁵N вместо ¹⁴N, ¹⁷O или ¹⁸O вместо ¹⁶O и ³³S, ³⁴S, ³⁵S или ³⁶S вместо ³²S. В определенных вариантах осуществления замещения нерадиоактивными изотопами могут придавать олигомерному соединению новые свойства, которые являются благоприятными для его применения в качестве инструмента терапии или исследований. В определенных вариантах осуществления замещения радиоактивными изотопами могут делать соединение подходящим для исследовательских или диагностических целей, таких как визуализация.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Варьирование последовательности PSD3 и ассоциация с FLD

[00192] В фазе исследования были отобраны 32 генетических меченых однонуклеотидных полиморфизма (SNP), ранее ассоциированных с триглицеридами в качестве основного ($n = 24$) или вторичного признака ($n = 8$) на значимом для всего генома уровне (Teslovich et al., *Nature* 466, 707-713, 2010) (**фиг. 1**). Затем все миссенс- и нонсенс-варианты в пределах 50 т. о. от выбранных локусов, которые были на чипе Illumina Human Exome Bead (включая меченые SNP, если они были доступны), были протестированы на наличие ассоциации с содержанием жира в печени при исследовании сердца в Далласе (DHS) (**фиг. 2**). Когда меченый SNP был межгенным, анализировали варианты обоих генов, смежных с меченым SNP.

[00193] Исследуемые когорты

[00194] Исследование сердца в Далласе (DHS). Исследование сердца в Далласе (DHS) представляет собой многоэтническую популяционную выборку жителей округа Даллас. Дизайн исследования и процедуры набора в клиническое исследование ранее были описаны в Victor, R.G., *et al.* The Dallas Heart Study: a population-based probability sample for the multidisciplinary study of ethnic differences in cardiovascular health (*Am J Cardiol* 93, 1473-1480 (2004)). Вкратце, первоначальная когорта была зарегистрирована в период между 2000 и 2002 гг, и все участники, а также их супруги или другие близкие люди были приглашены для повторной оценки в 2007-2009 гг (DHS-2). Во время включения в исследование все участники прошли подробный опрос и подверглись клиническому обследованию, которое включало измерение кровяного давления, антропометрию, сбор образцов крови и мочи и визуализирующие исследования. Этническая принадлежность была указана самостоятельно. Содержание триглицеридов в печени измеряли посредством протонной магнитно-резонансной спектроскопии (1H-MRS) у $n = 2736$ участников, как описано ранее в Browning, J.D., *et al.*, *Hepatology* 40, 1387-1395 (2004) и Szczepaniak, L.S., *et al.*, *Am J Physiol* 276, E977-989 (1999). Для настоящего исследования все анализы были основаны на перекрестных данных. Учитывая низкую распространенность тяжелого пьянства (>30 г/день), субъекты не были исключены из исследования на основании потребления алкоголя. Исследование было одобрено Институциональным наблюдательным советом Юго-Западного медицинского центра Техасского университета, и все индивидуумы дали письменное информированное согласие.

[00195] Когорта биопсии печени (LBC). Когорта биопсии печени (LBC) представляет собой межгрупповое исследование индивидуумов европейского

происхождения, которым была проведена биопсия печени по поводу подозрения на NASH или тяжелое ожирение, и которые были последовательно включены в клиническое исследование в трех европейских центрах. Исследование было ранее описано в Dongiovanni, P., et al., *Hepatology* 61, 506-514 (2015) и Mancina, R.M., et al., *Gastroenterology* (2016). В настоящее исследование были включены только индивидуумы с полными доступными данными в отношении как генотипа PSD3, так и гистологии печени. В них было включено в общей сложности 323 индивидуума из четвертого независимого финского центра. В настоящее исследование было включено 1951 индивидуума из 4 различных европейских центров: 1,022 (52%) были из Милана (амбулаторная служба метаболических заболеваний печени и из Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Policlinico Milano, Милан, Италия) (см. Valenti, L., et al., *J Hepatol* 55, 1409-1414 (2011)), 374 (19%) были из отделения заболеваний желудочно-кишечного тракта и печени Университетской больницы Палермо, Палермо, Италия (см. Petta, S., et al., *PLoS One* 9, e87523 (2014)), 410 (21%) были из Больничного округа Саво, Куопио, Финляндия (см. Simonen, M., et al., *Hepatology* 58, 976-982 (2013)) и 145 (7%) были из больничного округа Хельсинки и Уусимаа, Финляндия (см. Simonen, M. *et al.*, *J Hepatol* 64, 1167-1175 (2016)). Исключались индивидуумы с повышенным потреблением алкоголя (мужчины >30 г/день; женщины >20 г/день), вирусным и аутоиммунным гепатитом или другими причинами заболевания печени. Диагноз NASH был основан на наличии стеатоза с лобулярным некровоспалением и баллонированием или фиброзом. Активность заболевания оценивали по показателю активности NAFLD (NAS); фиброз определяли в соответствии с рекомендациями сети центров клинических исследований NAFLD, как описано в Kleiner, D.E., et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313-1321 (2005). Определения показателя биоптатов печени проводили независимые патологоанатомы, не осведомленными о статусе и генотипе пациентов. Исследование было одобрено комитетами по этике Fondazione IRCCS Ca' Granda (Милан), университетской больницы Палермо (Палермо) и больничного округа Северного Саво в Куопио (Финляндия), а также комитетом по этике больничного округа Хельсинки и Уусимаа (Финляндия).

[00196] Когорта британского биобанка. Британский биобанк представляет собой крупное когортное исследование, в котором приняли участие более 500000 взрослых индивидуумов (в возрасте от 40 до 69 лет на момент набора в исследование), которые посетили 22 центра набора по всей Великобритании в период с 2006 по 2014 год. Как

фенотипические, так и генотипические данные, использованные в настоящем исследовании, были получены из Британского биобанка под номером заявки 37142. Анализ был ограничен подмножеством участников британского биобанка с европейским происхождением (определяемых по самостоятельной оценке как "британцы", "ирландцы" или "представители европеоидной расы" после удаления выпадающих значений на основе первых двух основных генетических компонентов). Были исключены индивидуумы, у которых было (1) чрезмерное количество родственников (более 10 предполагаемых родственников третьей степени родства); (2) несоответствие между указанным полом и генетически предполагаемым полом или (3) предполагаемая анеуплоидия половых хромосом и те, кто был (4) идентифицирован Британским биобанком как выпадающие значения на основании гетерозиготности и пропуска, как описано в Canela-Xandri et al (*Nature Genetics* 50, 1593–1599 (2018)) и Crawford et al (*J. Med. Genet.*, 56, 131–138 (2019)). Участников Британского биобанка подвергали генотипированию с применением двух очень похожих массивов UK BiLEVE или UK Biobank Axiom (перекрытие > 95%). Затем данные генотипирования были условно рассчитаны на основе эталонных панелей 1000 Genomes Phase 3, гаплотипа UK10K и эталонного консорциума гаплотипов (HRC) (см. C. Vucroft *et al.*, The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature* 562, 203–209 (2018)). Данные о генотипе динуклеотидного изменения rs71519934 отсутствовали в Британском биобанке; rs7003060 (идентифицирующий первое изменение нуклеотида rs71519934) был среди вариантов, подвергнутых прямому генотипированию, и применялся вместо него. Применяли данные магнитно-резонансной визуализации (MRI) печени, полученные из протонной плотности жировой фракции (PDFF) (поле данных 22436), и участников сканировали с помощью MRI-сканера Siemens MAGNETOM Aera 1,5-T с применением 6-минутного протокола Dixon Vibe с двойным эхом, и далее был получен один мультиэхо-срез для анализа PDFF печени. Исследование Британского биобанка получило этическое одобрение Национального комитета по этике исследований в Северо-Западном многоцентровом центре Хейдока (ссылка 16/NW/0274).

[00197] Независимая репликативная когорта ЕС. В общем 674 взрослых индивидуума европеоидной расы с NAFLD (средний возраст 45 ± 12 лет) с $\text{BMI} \geq 30 \text{ кг/м}^2$ из третичных специализированных центров в Австрии ($n = 83$), Германии ($n = 559$) и Швейцарии ($n = 32$), которым была проведена чрескожная или хирургическая биопсия печени (см. V. R. Thangarandi et al., *Gut*, (2020)). NASH определяли по

показателю активности NAFLD (NAS). Наличие фиброза оценивали гистологически по классификации Клейнера (D. E. Kleiner et al., *Hepatology* **41**, 1313-1321 (2005)). У всех пациентов инфекционные (например, вирусный гепатит, ВИЧ), иммунологические, лекарственно-индуцированный стеатоз печени (например, амиодарон, метотрексат, стероиды, вальпроаты и т. д.) или наследственные причины (наследственный гемохроматоз, болезнь Вильсона) хронических заболеваний печени были исключены с помощью доступных мер. По по самостоятельной оценке не включались субъекты со средним потреблением алкоголя более 30 г/день (у мужчин) или 20 г/день (у женщин). Биоптаты печени изучали 2 опытных гистопатолога, не располагающих информацией. Все пациенты дали письменное информированное согласие на биопсию печени и генетическое тестирование.

[00198] Статистический анализ. Для DHS *P*-значения для ассоциаций между содержанием жира в печени и целевыми вариантами были рассчитаны с применением линейного регрессионного анализа с учетом возраста, пола и 4 ведущих основных компонента происхождения. Во всех анализах использовали аддитивную генетическую модель. Для LBC и для независимой репликативной когорты EU ассоциация между вариантом PSD3 rs71519934 и заболеванием печени оценивали в рамках аддитивной генетической модели посредством бинарного логистического (распространенность заболевания печени) или порядкового регрессионного анализа (гистологические особенности печени) с учетом возраста, пола, индекса массы тела (BMI), центра набора и числа мутантных аллелей I148M PNPLA3. Для Британского биобанка PDFF печени сначала подвергали обратному нормальному преобразованию на основе рангов, а затем ассоциации с PSD3 rs7003060 исследовали с применением линейной регрессии с учетом возраста, пола, BMI, первых десяти основных компонентах генома и типа массива в рамках аддитивной генетической модели. Для описательной статистики данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений или медианы и квартильного диапазона, если это необходимо. Категориальные признаки показаны в виде чисел и пропорций. Для непрерывных признаков *P*-значения рассчитывали посредством линейной регрессии в рамках аддитивной генетической модели без учета или с учетом возраста, пола и BMI. Ненормально распределенные признаки перед вводом в модель подвергали логарифмическому преобразованию. Для категориальных признаков *P*-значения рассчитывали с помощью критерия хи-квадрат или с помощью бинарной логистической регрессии, с учетом возраста, пола и BMI. Различия в уровнях

экспрессии в тканях человека оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для сравнения здоровых индивидуумов с индивидуумами с FLD) или с помощью линейного регрессионного анализа (для сравнения между генотипами). Для метаанализа гистологических когорт был выполнен метаанализ обратной дисперсии двух исследований (когорты биопсии печени и независимая репликативная когорта Центральной Европы) с применением пакета "мета" с моделями с фиксированным и случайным эффектом в версии R 3.6.1. Для исследований *in vivo* и *in vitro* данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Р-значения рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (*in vitro*) или одностороннего непараметрического критерия ANOVA Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения (*in vivo*).

[00199] Генотипирование и валидация

[00200] Генотипирование. Все участники из DHS предварительно подвергали генотипированию по вариантам с применением чипа Illumina Infinium Human Exome Bead Chip, как описано в J. Kozlitina et al., Nature genetics 46, 352–356 (2014) и S. Romeo et al., Nature genetics 40, 1461–1465 (2008). Участников из LBC и независимой репликативной когорты ЕС подвергали генотипированию посредством анализа с использованием 5'-нуклеазы TaqMan (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Зонд различения аллелей PSD3 rs71519934 не был коммерчески доступен. Пользовательский анализ для этого варианта был разработан следующим образом:

Контекстная последовательность:
 CGTTGTTACTTCAGCTGAAAGAGGTATTTTCNGGTAATTTTTTTGGCCAGCAGGG
 AGC[GT/AG]TTTGTTGACTCTCTGTGTTTTACNNCTGGCAGTGTCCANCTCTTTTTC
 CACCTGCTGANCTGAAAACTAGAAACAGCATCTTGGTCCA (SEQ ID NO: 21);

прямой праймер: CGTTGTTACTTCAGCTGAAAGAGGTA (SEQ ID NO: 22);

обратный праймер: TGGACCAAGATGCTGTTTCTAGTTT (SEQ ID NO: 23);

Последовательность репортера 1 (VIC): TCAACAAAACGTCCC (обратно комплементарная) (SEQ ID NO: 24);

Последовательность репортера 2 (FAM): TCAACAAACTGTCCC (обратно комплементарная) (SEQ ID NO: 25).

[00201] Анализ экспрессии генов в биоптатах печени человека. В биоптатах печени человека экспрессия мРНК различных изоформ PSD3, а также PSD3 и NAT2 при FLD по сравнению с отсутствием FLD была измерена у 77 участников из миланского

подмножества LBC. Секвенирование РНК выполняли с применением платформы Illumina HiSeq 4000 (Novogene, Гонконг, Китай), риды РНК сопоставляли с геномом человека, а количество ридов генов (эталонная сборка транскриптов человека Ensembl, версия 75) определяли с применением программного обеспечения RSEM. Для количественной оценки уровня экспрессии генов данные RSEM на количество генов были нормализованы с применением пакета DESeq2. От каждого пациента было получено информированное согласие, а протокол исследования был одобрен Комитетом по этике Fondazione IRCCS Ca' Granda, Милан, и соответствовал этическим принципам Хельсинкской декларации 1975 года.

[00202] Анализ экспрессии генов в иммортализованных клетках. РНК выделяли с помощью RNeasy Plus mini kit (Qiagen) и подвергали обратной транскрипции с применением высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Уровень экспрессии генов оценивали посредством количественной ПЦР в режиме реального времени с применением зондов TaqMan и мастер-микса (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Все реакции проводили в трехкратной повторности. Данные анализировали с применением способа $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

[00203] Экспрессия генов у мышей. РНК печени очищали с применением набора RNeasy (Qiagen, Хильден, Германия) и подвергали количественному ПЦР-анализу. Для количественного определения уровня экспрессии РНК применяли систему Applied Biosystems StepOne Plus RT-PCR, в которой применяется обнаружение флуоресценции посредством RT-PCR в режиме реального времени (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). мРНК PSD3 количественно определяли с применением набора зондов и праймеров Mm01351099_m1 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Уровни транскриптов РНК нормализовали к общим уровням РНК с применением реагента QuantiT RiboGreen RNA (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для экспрессии липогенного гена общую РНК выделяли из печени мышей с помощью набора RNeasy (Qiagen, Хильден, Германия). 100 нг общей РНК для каждого образца применяли для получения 3'-концевых библиотек RNAseq с применением набора 3'-мРНК Quantseq Kit (Lexogen, Вена, Австрия). Эти библиотеки объединяли и секвенировали на приборе для секвенирования NextSeq500 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния) до длины рида 50 п. н. и глубины 3-5 миллионов ридов на образец. Риды картировали с генными моделями с применением Salmon (версия 0.7.1) с применением режима количественного анализа на

основе квази-картирования и автоматического определения типа библиотек (Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. Nat Methods 14, 417-419 (2017)). Salmon (версия 0.7.1) обеспечивает быструю и безошибочную количественную оценку экспрессии транскриптов, а обилие генов было представлено как количество транскриптов на миллион (TPM) путем нормализации ридов, ассоциированных с генами, по общему количеству картированных ридов на образец.

[00204] Культура клеток. В стандартных условиях клетки гепатомы крысы McArdle (McA)-RH7777 (гомозиготы по 180T, что соответствует 186T в PSD3 человека в соответствии с выравниванием NP_056125.3 человека и XP_017455908.1 крысы) приобретали в ATCC и культивировали в DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), а гепатоциты человека Huh7 (PSD3 L186L) приобретали в банке клеток JCRB, Япония, и культивировали в DMEM (с низким содержанием глюкозы), содержащей 10% FBS. В экспериментальных условиях через 24 часа после посева клетки трансфицировали скремблированной или PSD3 siRNA (к крысиному или человеческому гену для клеток McA-RH7777 и Huh7 соответственно) и выращивали в обычной среде без FBS с различными добавками. Использовали смесь из 3 siRNA человека (Thermo Fisher; № по каталогу 4392420). siRNA PSD3 человека дополнительно описана в таблице 1 ниже.

Таблица 1

Обозначения siRNA	Смысловая последовательность	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO
siRNA1 (s23655)	GUAUUGGAAGUAC UACUAA _{tt}	26	UUAGUAGUACUUC CAAUAC _{ga}	29
siRNA2 (s23654)	CGCUAUGAAAUGU AUGUCA _{tt}	27	UGACAUACAUUUC AUAGCG _{gg}	30
siRNA3 (s23653)	CAACGAAUUUAGC AAACUA _{tt}	28	UAGUUUGC _{UAAA} UCGUUG _{tt}	31

В случае siRNA крысы применяли смесь 3 siRNA (Thermo Fisher; № по каталогу 4390771). siRNA PSD3 крысы дополнительно описана в таблице 2 ниже.

Таблица 2

Обозначения siRNA	Смысловая последовательность	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO
-------------------	------------------------------	-----------	----------------------------------	-----------

siRNA1 (s153470)	CGUUAUGAAAUUU AUGUCAAtt	32	UGACAUAAAUUUC AUAACGgg	35
siRNA2 (s157481)	CCAGGAACGUGAG CGAAUAtt	33	UAUUCGCUCACGU UCCUGGgt	36
siRNA3 (s157482)	CAACGAAUUUAGC AAGCUAtt	34	UAGCUUGC UAAAU UCGUUGtt	37

[00205] Количественное определение содержания внутриклеточного жира. Содержание внутриклеточного нейтрального жира визуализировали посредством окрашивания Oil Red O (ORO). Изображения получали с применением системы визуализации Axio KS 400 и программного обеспечения AxioVision 4.8 (Zeiss) при 100-кратном увеличении. Площадь, окрашенную ORO, количественно определяли с помощью BioPix, как описано ранее, например, в P. Pingitore et al., Hum. Mol. Genet. 25, 5212–5222 (2016). Перед окрашиванием клетки McA-RH7777 и Huh7 трансфицировали скремблированной siRNA или PSD3 (к крысиной или человеческой ПНК соответственно) и выращивали в обычной среде, не содержащей FBS, с добавлением 50 мкМ (McA-RH7777) и 25 мкМ (Huh7) олеиновой кислоты (ОА) в течение 48 часов.

[00206] Синтез триглицеридов *de novo*. Клетки McA-RH7777 и Huh7 высевали в трех повторностях в 6-луночные планшеты. Через двадцать четыре часа после посева клетки трансфицировали PSD3 siRNA или скремблированной (Scr) siRNA в течение 48 часов в среде DMEM с 10% FBS. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки инкубировали с DMEM без FBS + 5 мКи/мл ³H-глицерина (Perkin Elmer, Массачусетс, США) + 50 мкМ олеиновой кислоты (и 25 мкМ олеиновой кислоты для Huh7) в течение 15, 30 или 60 минут. Собирали клеточные лизаты и экстрагировали липиды смесью хлороформ:метанол (2:1) по методу экстракции Фолча. Органическую фазу высушили, повторно растворяли в метаноле и разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). Пятна, соответствующие триглицеридам, визуализировали парами йода и добавляли во флаконы со сцинтилляционной жидкостью. Радиоактивность измеряли сцинтилляционным счетчиком как число распадов в минуту (DPM).

[00207] Секреция аполипопротеина b. Клетки McA-RH7777 выращивали в колбах T-25 и трансфицировали с помощью siRNA PSD3 или Scr siRNA в DMEM с 10% FBS. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки инкубировали с DMEM без метионина и цистеина в течение 2 часов с последующей обработкой с помощью 0,05 мКи/мл ³⁵S Met/Cys (Perkin Elmer, MA, USA) + 50 мкМ ОА еще в течение 2 часов. Затем клетки

инкубировали со средой Чейза, состоящей из DMEM с избытком холодного L-метионина и L-цистеина (конечная концентрация 10 мМ, Sigma Aldrich, Миссури, США), в течение 5, 15, 30 или 60 минут, после чего среду и лизаты собирали. Затем Apo-b подвергали иммунопреципитации с применением агарозных гранул, покрытых антителом к Apo-b (Dako, Дания). Образцы элюировали из гранул кипячением в течение 5 минут в 60 мкл буфера для образцов SDS-PAGE, содержащего бета-меркаптоэтанол, и затем разделяли на SDS-PAGE с градиентом 3-8%. Затем гель высушивали, оставляли в течение ночи на пленке BAS-MS и визуализировали в фосфоимиджере (Fujifilm FLA-3000, Токио, Япония).

[00208] Бета-окисление. Клетки McA-RH7777 выращивали в трех повторностях в 6-луночных планшетах и трансфицировали с помощью siRNA PSD3 или siRNA Scr. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки инкубировали в течение 2 ч с 8,5 мкКи ³H-пальмитата плюс 55 мкмоль/л пальмитиновой кислоты в DMEM без FBS. Затем собирали 500 мкл среды и осаждали меченый пальмитат добавлением 50 мкл 20% БСА и 27 мкл 70% перхлорной кислоты. Супернатант собирали после центрифугирования при 12000 об/мин в течение пяти минут и добавляли вторую аликвоту 20% BSA. Это повторяли в общей сложности три раза. Затем конечный супернатант добавляли во флаконы со сцинтилляционной жидкостью. Радиоактивность измеряли сцинтилляционным счетчиком как число распадов в минуту (DPM).

[00209] **Результаты.** В общей сложности у европейцев было идентифицировано 3 миссенс-варианта в 3 генах (частота минорного аллеля (MAF) > 5% по данным проекта 1000 геномов, текущая сборка 154 dbSNP, выпущенная 21 апреля 2020 г.), которые были номинально ассоциированы ($P < 0,050$) с содержанием жира в печени в DHS с применением линейного регрессионного анализа в рамках аддитивной генетической модели с учетом возраста, пола и четырех основных компонентах происхождения. (**фиг. 2**). Среди этих вариантов TM6SF2 (rs58542926; $P = 5,7 \times 10^{-8}$) и GCKR (rs1260326; $P = 0,007$) являются двумя хорошо известными генетическими вариантами, ассоциированными с жировой болезнью печени и с циркулирующими триглицеридами, ассоциированными с увеличением содержания жира в печени в DHS (см. напр., E. K. Speliotes et al., PLoS Genet. 7, e1001324 (2011)). Было также обнаружено, что вариант гена PSD3, rs71519934, ассоциирован с более низким содержанием жира в печени ($P = 0,049$). Различия в клинических, антропометрических показателях, содержании липопротеинов и жира в печени также были стратифицированы по этническим группам (**фиг. 17**), где

наблюдалось снижение уровней циркулирующего общего холестерина для генотипа PSD3 rs71519934 у американцев европейского происхождения.

[00210] Вариант PSD3 rs71519934 исследовали в LBC (включая $n=1951$ европейца с высоким риском развития FLD с доступной биопсией печени) для выявления какой-либо связи с защитой от FLD (**фиг. 3**). В LBC минорный аллель PSD3 rs71519934 (186T) был ассоциирован с более низкой распространенностью стеатоза печени ($P = 5,9 \times 10^{-6}$), фиброза ($P = 0,006$), воспаления ($P = 9,9 \times 10^{-7}$) и баллонирования ($P=0,002$) (**фиг. 4**) с применением бинарного логистического регрессионного анализа в рамках аддитивной генетической модели, с учетом возраста, пола, BMI, центра набора и PNPLA3 rs738409.

[00211] Кроме того, носители минорного аллеля 186T были защищены от более тяжелого стеатоза печени ($P = 3,3 \times 10^{-7}$), воспаления ($P = 1,6 \times 10^{-7}$), баллонирования ($P = 0,001$) и фиброза ($P = 0,001$) (**фиг. 5A**), а с помощью порядкового регрессионного анализа в рамках аддитивной генетической модели использовали и корректировали по возрасту, полу, BMI, центру набора и PNPLA3 rs738409. Эти результаты были практически идентичными при дополнительной корректировке на другие генетические (TM6SF2 rs58542926 [E167K], MBOAT7 rs641738 и GCKR rs1260326 [L446P]) и экологические (наличие диабета и лечения холестерина) переменные, влияющие на FLD (**фиг. 16**). Кроме того, носители минорного аллеля 186T PSD3 имели более низкие уровни циркулирующего общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) ($P = 1,4 \times 10^{-6}$ и $P = 0,001$ соответственно) (**фиг. 7**). Было показано, что генетический вариант HSD17B13, приводящий к защите от FLD, взаимодействует с вариантом PNPLA3, а носители вредного аллеля PNPLA3 получают больше преимуществ от носительства защитного варианта HSD17B13 (см., например, H. Gellert-Kristensen et al., *Hepatology*, (2020)). Таким образом, протестировали связь между вариантами PSD3 и PNPLA3 в LBC, но не было выявлено связи между этими двумя генетическими вариантами при заболевании печени.

[00212] Эффект варианта PSD3 у британских участников европеоидного происхождения ($n = 10970$) из Британского биобанка с измерением содержания жира в печени посредством магнитно-резонансной визуализации, полученной из протонной плотности жировой фракции (PDFF), был проведен, чтобы понять ассоциацию варианта PSD3 с содержанием жира в печени. Генетические данные о динуклеотидной замене rs71519934 были недоступны, поэтому проанализировали rs7003060 (то есть в полном неравновесном сцеплении ($D'=1$, $r^2=1$) с rs71519934 у европейцев). В Британском

биобанке не было обнаружено ассоциации между минорным аллелем PSD3 и более низким содержанием жира в печени. Однако, поскольку генетические вариации, влияющие на FLD, имеют сильную связь ген-среда с избыточной массой тела, усиливающее их эффект (см., например, S. Stender *et al.*, Nat Genet 49, 842-847 (2017)), связь между PSD3 rs7003060 и BMI по отношению к содержанию жира в печени (измеренный с помощью PDFF) анализировали в Британском биобанке путем включения члена взаимодействия BMI \times rs7003060 в линейный регрессионный анализ с учетом возраста, пола, BMI, первых десяти основных компонентов генома. Было обнаружено, что этот вариант взаимодействует с BMI ($P = 0,046$) с более высокой степенью BMI, раскрывая защитный эффект варианта rs7003060 в отношении стеатоза печени. Различия в содержании жира в печени у генотипов PSD3 rs7003060 после стратификации по степени тяжести избыточной массы тела/ожирения, измеренной посредством BMI, указывали на, что у носителей минорного аллеля PSD3 с тяжелым ожирением ($BMI > 35$) было более низкое содержание жира в печени ($\beta = -0,175$, $P = 0,02$) (**фиг. 18**).

[00213] Связь между генотипом PSD3 и BMI в LBC дополнительно валидировали путем тестирования ассоциации между вариантом PSD3 и защитой от заболевания печени у людей в независимой репликативной когорте ЕС. Было обнаружено, что минорные аллели PSD3 были ассоциированы с более низкой распространенностью стеатоза печени ($P = 0,024$), фиброза ($P = 0,049$) и баллонирования ($P = 0,047$), а также с менее тяжелым фиброзом и баллонированием ($P = 0,040$ и $P = 0,048$), соответственно (**фиг. 6**). В этой когорте, стратифицированной по генотипу PSD3, не обнаружили различий в клинических или метаболических признаках (**фиг. 7**). Проводили метаанализ двух когорт с доступной биопсией печени, а именно LBC и с независимой репликативной когорты ЕС. Как в моделях с фиксированным, так и в случайном эффекте генетическая ассоциация была сильнее для всех исследованных признаков, за исключением наличия и тяжести воспаления, где связь была ослаблена при применении модели со случайным эффектом (**фиг. 8А - В**).

[00214] Экспрессия PSD3 в печени человека и FLD. Белок PSD3 имеет 18 аннотированных изоформ (выпуск Ensembl 75). При анализе транскриптома биоптатов печени у подгруппы индивидуумов ($n=77$) из LBC было установлено, что изоформа a (аннотированная как NP_056125 в NCBI и как 001 ENST00000327040 в Ensembl) имеет самый высокий уровень экспрессии в печени (**фиг. 9А**). Общие уровни мРНК PSD3 в печени были выше в печени с FLD, чем таковые в печени без FLD (**фиг. 5В**), в то время

как не наблюдали различий в уровне мРНК NAT2 (фиг. 5С), что позволяет предположить, что PSD3, а не NAT2 вовлечен в FLD. Когда авторы настоящего изобретения стратифицировали индивидуумов на основе генотипа PSD3, не было выявлено различий в уровне экспрессии мРНК PSD3 или NAT2 (фиг. 9В и 9С).

[00215] Первичные гепатоциты человека от доноров, несущих аминокислотные изменения 186L и 186T в гомозиготности, сравнивали, чтобы выяснить механизм, лежащий в основе ассоциации между минорным аллелем rs71519934 и более низким содержанием жира в печени. В соответствии с генетической ассоциацией первичные гепатоциты человека, гомозиготные по аллелю 186T, культивированные в 2D, имели более низкое содержание нейтрального липида жира ($p = 0,007$), измеренное с помощью окрашивания Oil Red O, по сравнению с гомозиготными гепатоцитами 186L (фиг. 19А). Чтобы исследовать уровни PSD3 в двух разных генотипах, авторы настоящего изобретения получали антитело, специфичное к PSD3 человека (поликлональные антитела, направленные к рекомбинантному PSD3, получали после иммунизации кроликов, а ведущее антитело валидировали с помощью siRNA, осуществляющей сайленсинг PSD3 в клетках гепатомы человека HepaRG, исключая сигнал в вестерн-блоттинге). Клетки инкубировали с различным количеством олеиновой кислоты (ОА) (0, 10 и 25 мкМ) и исследовали уровни белка у двух генотипов в первичных гепатоцитах. В целом количество PSD3 повышалось с увеличением количества олеиновой кислоты (фиг. 19В). Однако для каждой концентрации олеиновой кислоты уровень экспрессии белка PSD3 была ниже в клетках, гомозиготных по аллелю 186T. Дифференциально экспрессируемые гены (DEG), участвующие в гомеостазе липидов с помощью RNA-Seq, показали сильное снижение уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе и секреции триглицеридов и биосинтезе холестерина, в то время как уровень экспрессии гена *PGC-1 α* , участвующего в митохондриальном биогенезе, был увеличен (фиг. 19С).

Пример 2. Отрицательная регуляция PSD3 с помощью SiRNA обеспечивает защиту от FLD

[00216] Результаты эксперимента 1. **Отрицательная регуляция PSD3 в гепатоцитах крысы**

[00217] Гипотезу о том, что отрицательная регуляция PSD3 приведет в результате к снижению содержания внутриклеточного жира, проверяли с применением siRNA в иммортализованных гомозиготных гепатоцитах крысы (клетки гепатомы крысы McArdle [McA-RH7777]) по 180T, что соответствует 186T у PSD3 человека. В этих клетках

отрицательная регуляция PSD3 приводила в результате к снижению содержания внутриклеточных липидов, измеренному окрашиванием ORO (фиг. 10А). Кроме того, отрицательная регуляция PSD3 в клетках McA-RH7777 приводила в результате к снижению продукции триглицеридов, измеренной как синтез триглицеридов *de novo* (фиг. 10В) и как экспрессия мРНК генов, участвующих в синтезе триглицеридов (фиг. 11). Более того, секреция липопротеинов очень низкой плотности, измеренная как секреция аполипопротеина-В (фиг. 10С), также была ниже по сравнению с клетками, трансфицированными скремблированной контрольной siRNA. Не было обнаружено различий во внутриклеточном использовании липидов, измеренном как *бета*-окисление ((фиг. 10D). Накопление внутриклеточных липидов (фиг. 12А) и синтез триглицеридов воспроизводили для подтверждения данных с применением радиоактивно меченных трассеров в клетках гепатомы человека, клетках Huh7, несущих вариант аллеля PSD3 L186L, после отрицательной регуляции PSD3 (фиг. 12В) и получали практически идентичные результаты. Таким образом, отрицательная регуляция как эндогенно экспрессируемого треоина PSD3, так и лейцина PSD3 приводила в результате к уменьшению уровней внутриклеточных липидов.

Чтобы проверить, приводит ли отрицательная регуляция PSD3 к изменениям в активации ARF6, PSD3 подвергали отрицательной регуляции в клетках Huh7, и уровни активированного ARF6 измеряли с применением анализа осаждения белка GGA3, связывающего домен (PBD). Клетки Huh7 гепатомы человека временно трансфицировали siRNA SCR отрицательного контроля (AM4611, Thermo Fisher Scientific), siRNA PSD3 (смесь из s23653, s23654 и s23655, Thermo Fisher Scientific, описанная выше) или siRNA ARF6 (смесь из s1565, s1566 и s1567, Thermo Fisher Scientific). siRNA ARF6 человека дополнительно описана в таблице 3 ниже.

Таблица 3

Обозначения siRNA	Смысловая последовательность	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO
siRNA1 (s1565)	GUCUCAUCUUCGU AGUGGAtt	38	UCCACUACGAAGA UGAGACct	41
siRNA2 (s1566)	AGACGGUGACUUA CAAAAAtt	39	UUUUUGUAAGUCA CCGUCUcc	42
siRNA 3 (s1567)	CCAAGGUCUCAUC UUCGUAtt	40	UACGAAGAUGAGA CCUUGGgt	43

Через 48 часов после трансфекции клеточные лизаты инкубировали с агарозными гранулами GGA3 PBD, которые избирательно выделяют и осаждают эндогенный активный ARF6 (ARF6-GTP). После преципитации активный ARF6-GTP определяли посредством иммуноблоттинга с применением антитела к ARF6, входящего в набор (фиг. 20А). Клетки, трансфицированные с помощью siRNA ARF6, применяли в качестве положительного контроля. Эффективность нокдауна показала уменьшение на ~60% для PSD3 и ~75% для ARF6, что было оценено посредством количественной ПЦР в режиме реального времени, проанализированной способом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (фиг. 20В). На гистограмме показано относительное соотношение ARF6-GTP (активный), рассчитанное как GTP-ARF6/калнексин (фиг. 20С).

[00218] Результаты эксперимента 2. Отрицательная регуляция PSD3 в первичных гепатоцитах человека

[00219] Гипотеза также была проверена с применением siRNA (такой же, как указано выше) на первичных гепатоцитах человека в печени индивидуумов с FLD. Первичные гепатоциты человека брали у доноров, гомозиготных по аллелю либо 186L, либо 186T, и культивировали в 2D и 3D. Для культуры 2D после прикрепления клеток на чашках, покрытых коллагеном, клетки инкубировали с обычной средой для выращивания, дополненной 10 мкМ олеиновой кислоты, и трансфицировали с помощью скремблированной siRNA отрицательного контроля (SCR) или siRNA PSD3 в течение 48 часов.

[00220] Содержание внутриклеточного нейтрального жира визуализировали посредством окрашивания Oil Red O (ORO) и количественно определяли с помощью *Віоріх* в первичных гепатоцитах человека, несущих аллель 186L (фиг. 21А), и первичных гепатоцитах человека, несущих аллель 186Т (фиг. 21В). Средняя эффективность отрицательной регуляции PSD3 составила ~ 80%, что было оценено с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, проанализированной методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и посредством вестерн-блоттинга для обоих типов доноров. Для культуры 3D первичных гепатоцитов человека получали сфероиды путем посева 2000 клеток/лунка в 96-луночную круглодонную колбу вместе со смесью для трансфекции в общем объеме среды, составляющем 100 мкл. Для получения сфероидов аллеля 186Т добавляли 5 нМ FMK-Z-VAD для облегчения образования сфероидов. Через 24 часа добавляли дополнительную среду для выращивания до достижения общего объема, составляющего 200 мкл/лунку. 50% всей среды пополняли свежей средой каждые 48 часов. Через 7 дней

после формирования сфероиды собирали и срезы с концентрацией, составляющей 8 мкМ, подвергали окрашиванию ORO для визуализации содержания внутриклеточного нейтрального жира. Ядра окрашивали с помощью DAPI, а результат окрашивания ORO определяли количественно по изображению J, нормализованному на число ядер первичных сфероидов гепатоцитов человека, несущих аллель 186L (фиг. 21C), и первичных сфероидов гепатоцитов человека, несущих аллель 186T (фиг. 21D). Средняя эффективность нокдауна гена составила ~ 50-60% по оценке количественной ПЦР в режиме реального времени, проанализированной методом 2- $\Delta\Delta C_t$ для обоих типов доноров. Уровни клеточного АТФ как мера жизнеспособности клеток оставались стабильными у групп со скремблированной siRNA отрицательного контроля и PSD3.

Пример 3. Отрицательная регуляция PSD3 с помощью ASO обеспечивает защиту от FLD

[00221] Синтез антисмысловых олигонуклеотидов (ASO). Химерные 16-мерные фосфоротиоатные ASO, содержащие 2',4'-затрудненный 2'-О-этил (сEt) в положениях 1-3 и 14-16 и трехантеннарный галактозамин (GalNAc), присоединенный к 5'-концу ASO, были синтезированы в Ionis Pharmaceuticals (Карлсбад, Калифорния), как описано ранее Østergaard et al. (Bioconjug. Chem. 26, 1451–1455 (2015)). В этом исследовании применяли два ASO: один с последовательностью пары оснований, нацеливающейся на мышинный PSD3; ASO PSD3 (5'-GTATTAATACTCTCTC-3'; SEQ ID NO: 1), и второй с контрольной ASO, нацеливающейся на неизвестный мышинный ген (5'-GGCCAATACGCCGTCA-3"; SEQ ID NO: 19).

[00222] Животные и обработка с помощью ASO. Все процедуры и протоколы исследований на мышах были одобрены институциональным комитетом по уходу и использованию животных. Все мыши были получены из лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн) и их помещали в клетки с циклом свет/темнота 12 ч/12 ч и кормили *ad libitum* в течение всего периода исследований. Шестинедельные самцы мышей C57BL/6 (гомозиготы по 147T, что соответствует 186T в PSD3 человека согласно выравниванию NP_056125.3 человека и мыши XP_017168192.1) получали диету, вызывающую NASH (D16010101, Research Diets) в течение 34 недель. Затем у мышей брали кровь и рандомизировали в группы исследования в зависимости от массы тела и уровней ALT в плазме крови ($n = 9-10$ на группу). Мышей кормили в соответствии с диетой, индуцирующей NASH, и обрабатывали физиологическим раствором, контрольным ASO GalNAc (5 мг/кг/неделя) или ASO GalNAc PSD3 (5 мг/кг/неделя) в течение 16 недель

путем еженедельной подкожной инъекции. В течение периода обработки с помощью ASO значения веса тела контролировали еженедельно. Через семьдесят два часа после последней дозы ASO мышей вводили в наркоз, кровь собирали путем пункции сердца, а ткани собирали и либо быстро замораживали в жидком азоте, либо фиксировали в формалине для гистологических анализов. Кровь центрифугировали при $3000 \times g$ и собирали плазму крови. Плазму крови и быстрозамороженные ткани хранили при -80°C .

[00223] Биохимия плазмы крови и печени. Количественно определяли трансаминазы плазмы крови (AST, ALT), общий холестерин плазмы крови, триглицериды плазмы крови, холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL) (LDL-C) и холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL) (HDL-C) с применением клинического анализатора Olympus (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния). Триглицериды печени, свободный холестерин и эфиры холестерина определяли количественно, как описано в T. P. Carr, C. J. Andresen, L. L. Rudel, Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin. Biochem.* **26**, 39–42 (1993).

[00224] Гистопатология и анализ изображения. После фиксации формалином, обезвоживания и заливки парафином срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (HE) и пикросириусом красным (PSR) в соответствии со стандартными процедурами. Последовательные срезы иммуногистохимически окрашивали для коллагена 1a1 (Coll1a1, LS-C343921, BioSite, США) в автоматизированной системе Ventana Ultra (Ventana Medical Systems, Inc., Roche Group, США). Анализ изображений проводили на цифровых изображениях с применением программного обеспечения Visiopharm Integrator System (версия 2018.09, Visiopharm, Хёрсхольм, Дания). Неокрашенную площадь (липиды) на предметных стеклах, окрашенных HE, определяли количественно и соотносили к общей площади среза. Стеатоз печени, воспаление, показатель активности FLD и стадию фиброза оценивали в срезах печени, окрашенных с помощью HE и PRS, в соответствии со способами, описанными в Kleiner *et al* (Hepatology 41, 1313–1321 (2005)). Все гистологические оценки проводил сертифицированный ветеринарный патологоанатом, не располагающий информацией.

[00225] Экспрессия генов у мышей. РНК печени очищали с применением набора RNeasy (Qiagen, Хильден, Германия) и подвергали количественному ПЦР-анализу. Для количественного определения уровня экспрессии РНК применяли систему Applied Biosystems StepOne Plus RT-PCR, в которой применяется обнаружение флуоресценции

посредством RT-PCR в режиме реального времени (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). мРНК PSD3 количественно определяли с применением набора зондов и праймеров Mm01351099_m1 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Уровни транскриптов РНК нормализовали к общим уровням РНК с применением реагента Quant-iT RiboGreen RNA (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс).

[00226] Для экспрессии липогенного гена общую РНК выделяли из печени мышей с помощью набора RNaseasy (Qiagen, Хильден, Германия). 100 нг общей РНК для каждого образца применяли для получения 3'-концевых библиотек RNAseq с применением набора 3'-мРНК Quantseq Kit (Lexogen, Вена, Австрия). Эти библиотеки объединяли и секвенировали на приборе для секвенирования NextSeq500 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния) до длины рида 50 п. н. и глубины 3-5 миллионов ридов на образец. Риды картировали с моделями генов с применением Salmon (версия 0.7.1) с применением режима количественного анализа на основе квази-картирования и автоматического определения типа библиотек. Salmon (версия 0.7.1) обеспечивает быструю и безошибочную количественную оценку экспрессии транскриптов, а обилие генов было представлено как количество транскриптов на миллион (TPM) путем нормализации ридов, ассоциированных с генами, по общему количеству картированных ридов на образец.

[00227] Результаты. PSD3 печени подвергали отрицательной регуляции у мышей путем введения антисмысловых олигонуклеотидов (ASO), конъюгированных с трехантеннарным *N*-ацетилгалактозамином (GalNAc). Мышей C57BL/6 кормили в соответствии с диетой, вызывающей неалкогольный стеатогепатит (NASH), в течение в общей сложности 50 недель, а в течение последних 16 недель группы мышей обрабатывали с помощью ASO PSD3, контрольного ASO или физиологического раствора. Обработка с помощью PSD3 ASO заметно снижала (-98%) уровень экспрессии мРНК PSD3 в печени (**фиг. 13A**) и снижало вес печени, общее содержание триглицеридов в печени и уровень ALT в плазме крови (**фиг. 13B - D**). Обработка с помощью ASO PSD3 не влияла на вес тела мышей (**фиг. 14A**). Кроме того, обработка с помощью ASO PSD3 снижала уровень общего свободного холестерина в печени, уровень эфира холестерина в печени, уровень аспартатаминотрансферазы (AST) в плазме крови, уровень общего холестерина и общего LDL-C, но не изменяло уровень триглицеридов или холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) в плазме крови (HDL-C) (**фиг. 14B - H**). С точки зрения гистологии обработка с помощью ASO PSD3 снижала

уровень белка коллагена 1a1 (Colla1) печени и уровни капель липидов в печени (**фиг. 13E - F**).

[00228] Тяжесть заболевания печени оценивали с помощью порядкового регрессионного анализа, и было обнаружено, что обработка с помощью ASO PSD3 снижала тяжесть стеатоза и воспаления, а также показатель активности FLD (NAS), хотя показатель фиброза печени существенно не изменился (**фиг. 13G**). Оценивали уровни экспрессии генов, участвующих в синтезе триглицеридов, и было обнаружено, что они согласуются с экспериментами *in vitro* в гепатоцитах McA-RH7777 (**фиг. 11**), где отрицательная регуляция PSD3 у мышей, получавших диету, вызывающую NASH, снижала уровень экспрессии генов, участвующих в липогенезе *de novo* (**фиг. 15**).

[00229] Все ссылки, цитируемые в данном документе, в том числе патенты, заявки на патенты, статьи, учебники и т. п., и ссылки, цитируемые в данном документе, до той степени, в которой они уже не являются таковыми, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, эффективного в отношении понижения содержания внутриклеточного жира в клетке печени у субъекта, для изготовления или получения лекарственного препарата для лечения жировой болезни печени, где соединение содержит полинуклеотид.

2. Применение соединения, эффективного в отношении понижения содержания внутриклеточного жира в клетке печени у субъекта, для лечения жировой болезни печени, где соединение содержит полинуклеотид.

3. Применение соединения, эффективного в отношении понижения уровня холестерина у субъекта, для изготовления или получения лекарственного препарата для лечения жировой болезни печени, где соединение содержит полинуклеотид.

4. Применение соединения, эффективного в отношении понижения уровня холестерина у субъекта, для лечения жировой болезни печени, где соединение содержит полинуклеотид.

<i>Локус</i>	Метка SNP	Ведущий признак	Другие признаки
<i>ANGPTL3</i>	rs2131925	TG	TC, LDL
<i>GALNT2</i>	rs4846914	HDL	TG
<i>APOB</i>	rs1042034	TG	HDL
<i>GCKR</i>	rs1260326	TG	TC
<i>COBLL1/LOC101929615/GRB14</i>	rs10195252	TG	
<i>IRS1/CUL3</i>	rs2972146	HDL	TG
<i>MSL2L1/PCCB</i>	rs645040	TG	
<i>KLHL8</i>	rs442177	TG	
<i>MAP3K1</i>	rs9686661	TG	
<i>TIMD4</i>	rs6882076	TC	LDL, TG
<i>HLA/WASF5P</i>	rs2247056	TG	
<i>TYW1B</i>	rs13238203	TG	
<i>MLXIPL/TBL2/BCL7B</i>	rs17145738	TG	HDL
<i>PINX1</i>	rs11776767	TG	
<i>NAT2/PSD3</i>	rs1495741	TG	TC
<i>LPL/SLC18A1</i>	rs12678919	TG	HDL
<i>TRIB1/LOC101927634</i>	rs2954029	TG	TC, LDL, HDL
<i>JMJD1C</i>	rs10761731	TG	
<i>CYP26A1/NIP7P1</i>	rs2068888	TG	
<i>FADS1-2-3</i>	rs174546	TG	HDL, TC, LDL
<i>APOA1</i>	rs964184	TG	TC, HDL, LDL
<i>LRP1</i>	rs11613352	TG	HDL
<i>ZNF664</i>	rs4765127	HDL	TG
<i>CAPN3</i>	rs2412710	TG	
<i>FRMD5</i>	rs2929282	TG	
<i>LIPC</i>	rs1532085	HDL	TC, TG
<i>CTF1</i>	rs11649653	TG	
<i>CETP/HERPUD1</i>	rs3764261	HDL	TC, LDL, TG
<i>CILP2/TM6SF2/SUGP1</i>	rs10401969	TC	TG, LDL
<i>APOE/APOC1</i>	rs439401	TG	
<i>PLTP/PCIF1</i>	rs6065906	HDL	TG
<i>PLA2G6</i>	rs5756931	TG	

ФИГ. 1

Chr	Положение	rsID	Ген	Амино кислотная замена	Нуклеотидная замена	N0	N1	N2	MAF^	MAF EUR^^	P-значение	Beta	SE
2	27730940	rs1260326	<i>GCKR</i> *	L446P	G/A	1515	972	247	27%	41%	0,007	0,03	0,01
8	18872307-08	rs71519934	<i>PSD3</i>	L186T	AC/CT	1907	728	101	17%	33%	0,049	-0,02	0,01
19	19379549	rs58542926	<i>TM6SF2</i>	E167K	G/A	2470	259	7	5%	7%	$5,7 \times 10^{-8}$	0,12	0,02

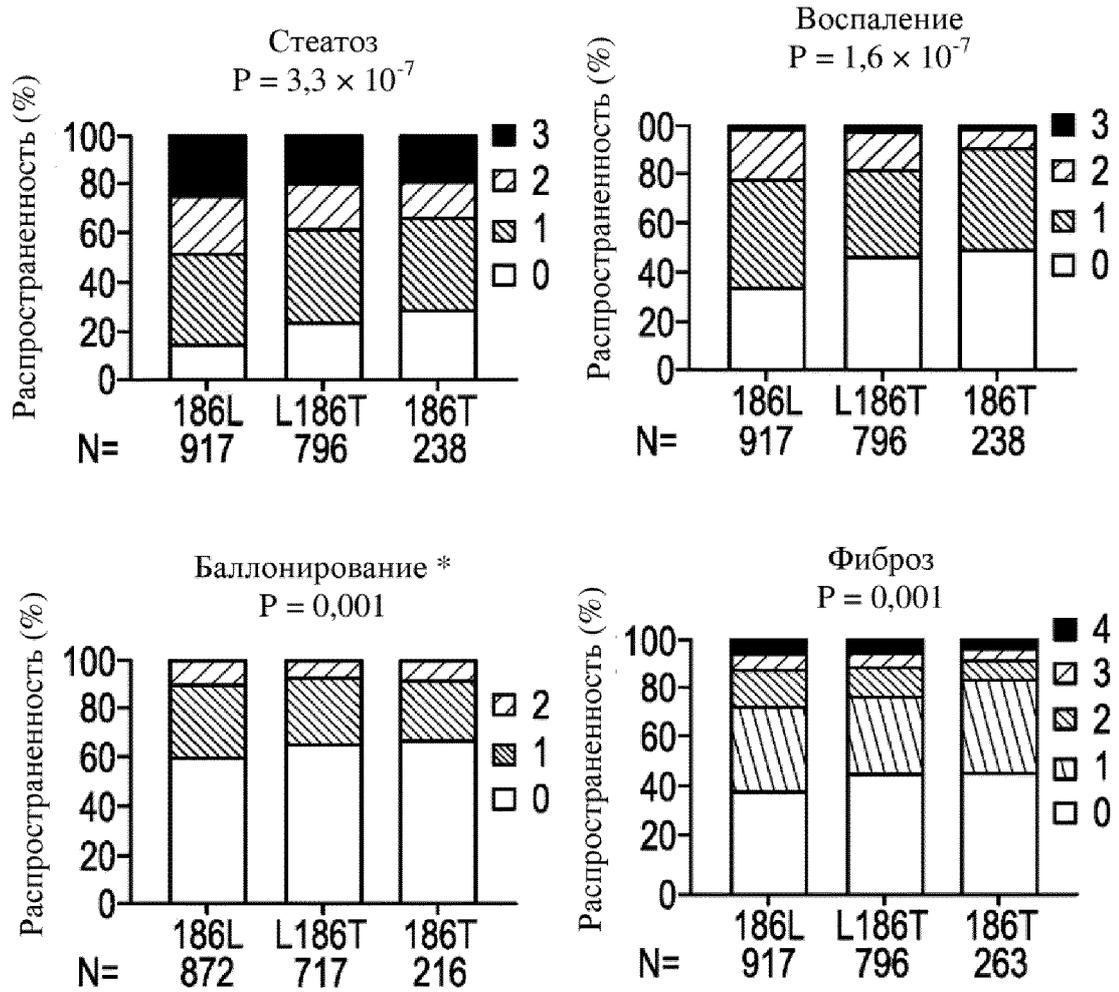
ФИГ. 2

Когорта биопсии печени	N	1951
Антропометрические признаки	Возраст, лет	47 ± 12
	Мужской пол, n (%)	909 (47)
	BMI, кг/м ²	37 ± 9
Метаболические признаки	Наличие диабета, n (%)	507 (26)
	Общий холестерин, ммоль/л	4,90 ± 1,14
	HDL, ммоль/л	1,25 ± 0,36
	LDL, ммоль/л	2,93 ± 0,99
	Триглицериды, ммоль/л	1,35 (0,99-1,91)
	ALT, МЕ/Л	38(23-63)
Гистология печени	Наличие стеатоза, n (%)	1551 (79)
	Наличие фиброза, n (%)	1074 (55)
	Наличие воспаления, n (%)	1134 (58)
	Наличие баллонирования*, n (%)	652 (36)
Центр набора	Куопио, Финляндия, n (%)	410 (21)
	Хельсинки, Финляндия, n (%)	145 (7)
	Палермо, Италия, n (%)	374 (19)
	Милан, Италия, n (%)	1022 (52)
Центральноевропейская когорта	N	674
Антропометрические признаки	Возраст, лет	45±12
	Мужской пол, n (%)	236 (35)
	BMI, кг/м ²	46±10
Метаболические признаки	Наличие диабета, n (%)	192 (31)
	Общий холестерин, ммоль/л	-
	HDL, ммоль/л	-
	LDL, ммоль/л	-
	Триглицериды, ммоль/л	-
	ALT, МЕ/Л	29 (20-46)
Гистология печени	Наличие стеатоза, n (%)	549 (81)
	Наличие фиброза, n (%)	255 (38)
	Наличие воспаления, n (%)	212 (31)
	Наличие баллонирования, n (%)	196 (29)
Центр набора	Германия, n (%)	559 (83)
	Австрия, n (%)	83 (12)
	Швейцария, n (%)	32 (5)

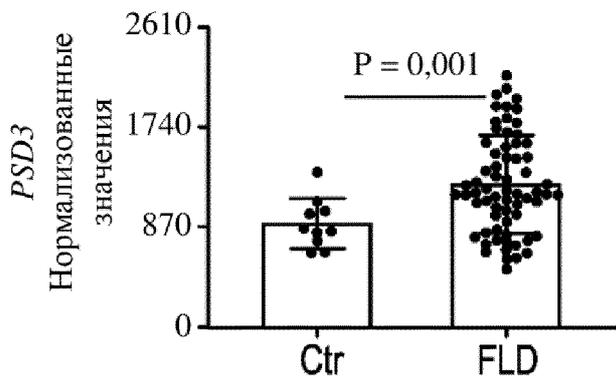
ФИГ. 3

	<i>P-значение</i>	OR	CI	
Наличие стеатоза	$5,9 \times 10^{-6}$	0,67	0,57	0,80
Наличие фиброза	0,006	0,82	0,72	0,94
Наличие воспаления	$9,9 \times 10^{-7}$	0,70	0,61	0,81
Наличие баллонирования*	0,002	0,79	0,68	0,92

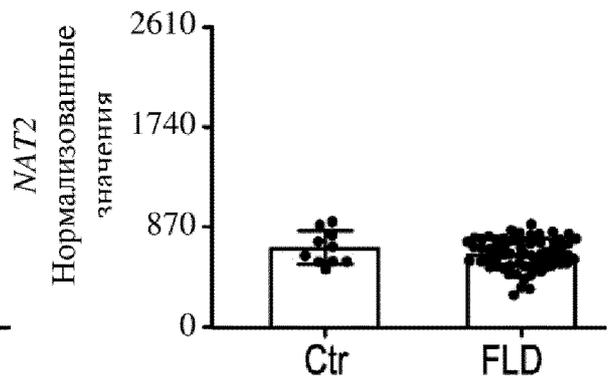
ФИГ. 4



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

	<i>P-значение</i>	OR	CI	
Наличие заболевания				
Стеатоз	0,024	0,69	0,50	0,95
Фиброз	0,049	0,77	0,59	1,00
Воспаление	<u>0,524</u>	0,92	0,70	1,20
Баллонирование	0,047	0,75	0,56	1,00
Тяжесть заболевания				
Стеатоз	<u>0,158</u>	0,85	0,69	1,06
Фиброз	0,040	0,77	0,60	0,99
Воспаление	<u>0,355</u>	0,88	0,68	1,15
Баллонирование	0,048	0,75	0,57	1,00

ФИГ. 6

Когорта биопсии печени	186L	L186T	186T	P-значение
N	917	796	238	
Возраст, лет	47 ± 13	47 ± 12	48 ± 13	0,101
Мужской пол, n (%)	434 (47)	376 (47)	99 (42)	0,218
BMI, кг/м ²	35,7 ± 9,0	37,1 ± 8,8	38,2 ± 8,9	2,1 × 10 ⁻⁵
Наличие диабета, n (%)	222 (24)	212 (27)	73 (31)	0,571
Общий холестерин, ммоль/л	5,08 ± 1,13	4,78 ± 1,14	4,62 ± 1,09	1,4 × 10 ⁻⁶
HDL, ммоль/л	1,29 ± 0,39	1,22 ± 0,33	1,2 ± 0,33	0,001
LDL, ммоль/л	3,05 ± 0,99	2,86 ± 0,98	2,71 ± 0,94	0,001
Триглицериды, ммоль/л	1,35 (0,99-1,91)	1,36 (1,00-1,96)	1,32 (0,98-1,85)	0,828
ALT, МЕ/Л	39 (23-66)	38 (23-61)	37 (24-58)	0,173
Центральноевропейская когорта				
N	330	282	62	
Возраст, лет	44 ± 13	46 ± 12	43 ± 12	0,955
Мужской пол, n (%)	111 (34)	102 (36)	23 (37)	0,469
BMI, кг/м ²	46 ± 9	46 ± 11	45 ± 11	0,837
Наличие диабета, n (%)	89 (30)	82 (32)	21 (36)	0,295
Общий холестерин, ммоль/л	-	-	-	-
HDL, ммоль/л	-	-	-	-
LDL, ммоль/л	-	-	-	-
Триглицериды, ммоль/л	-	-	-	-
ALT, МЕ/Л	31 (21-46)	28 (19-45)	27 (20-44)	0,985

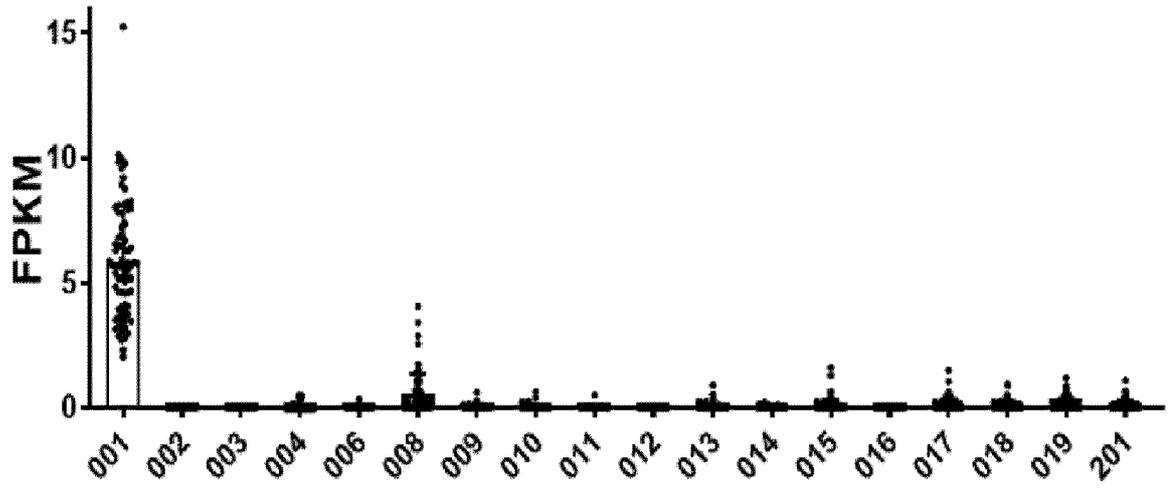
ФИГ. 7

Тяжесть стеатоза	P	OR	CI	
LBC	3,3E-07	0,729	0,645	0,823
Репликация	0,158	0,850	0,690	1,060
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	2,4E-07	0,755	0,678	0,840
Случайные эффекты	1,24E-04	0,763	0,665	0,876
Тяжесть фиброза				
	P	OR	CI	
LBC	0,001	0,811	0,715	0,921
Репликация	0,04	0,770	0,600	0,990
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	1,13E-04	0,803	0,718	0,898
Случайные эффекты	1,13E-04	0,803	0,718	0,898
Тяжесть воспаления				
	P	OR	CI	
LBC	1,6E-07	0,711	0,626	0,807
Репликация	0,355	0,880	0,680	1,150
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	2,81E-07	0,739	0,659	0,829
Случайные эффекты	0,008	0,764	0,627	0,931
Тяжесть баллонирования				
	P	OR	CI	
LBC	0,001	0,777	0,669	0,902
Репликация	0,048	0,750	0,570	1,000
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	1,27E-04	0,771	0,675	0,881
Случайные эффекты	1,27E-04	0,771	0,675	0,881

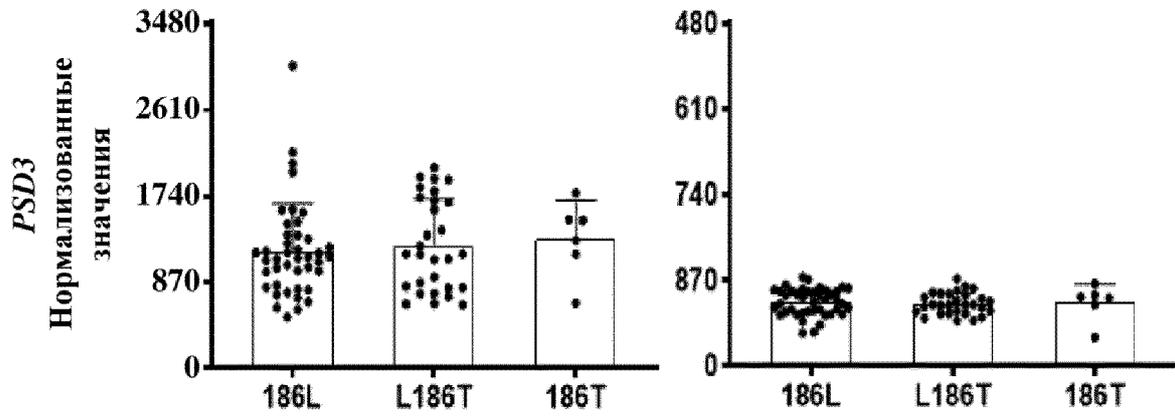
ФИГ. 8А

Наличие стеатоза	P	OR	CI	
LBC	5,90E-06	0,670	0,570	0,800
Репликация	0,024	0,690	0,500	0,950
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	4,22E-07	0,674	0,579	0,786
Случайные эффекты	4,22E-07	0,674	0,579	0,786
Наличие фиброза				
	P	OR	CI	
LBC	0,006	0,820	0,720	0,940
Репликация	0,049	0,770	0,590	1,000
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	7,95E-04	0,808	0,714	0,915
Случайные эффекты	7,95E-04	0,808	0,714	0,915
Наличие воспаления				
	P	OR	CI	
LBC	9,90E-07	0,700	0,610	0,810
Репликация	0,524	0,920	0,700	1,200
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	4,53E-06	0,747	0,659	0,846
Случайные эффекты	0,073	0,785	0,603	1,023
Наличие баллонирования				
	P	OR	CI	
LBC	0,002	0,790	0,680	0,920
Репликация	0,047	0,750	0,560	1,000
<i>Мета-анализы</i>				
Фиксированный эффект	2,52E-04	0,781	0,684	0,892
Случайные эффекты	2,52E-04	0,781	0,684	0,892

ФИГ. 8В

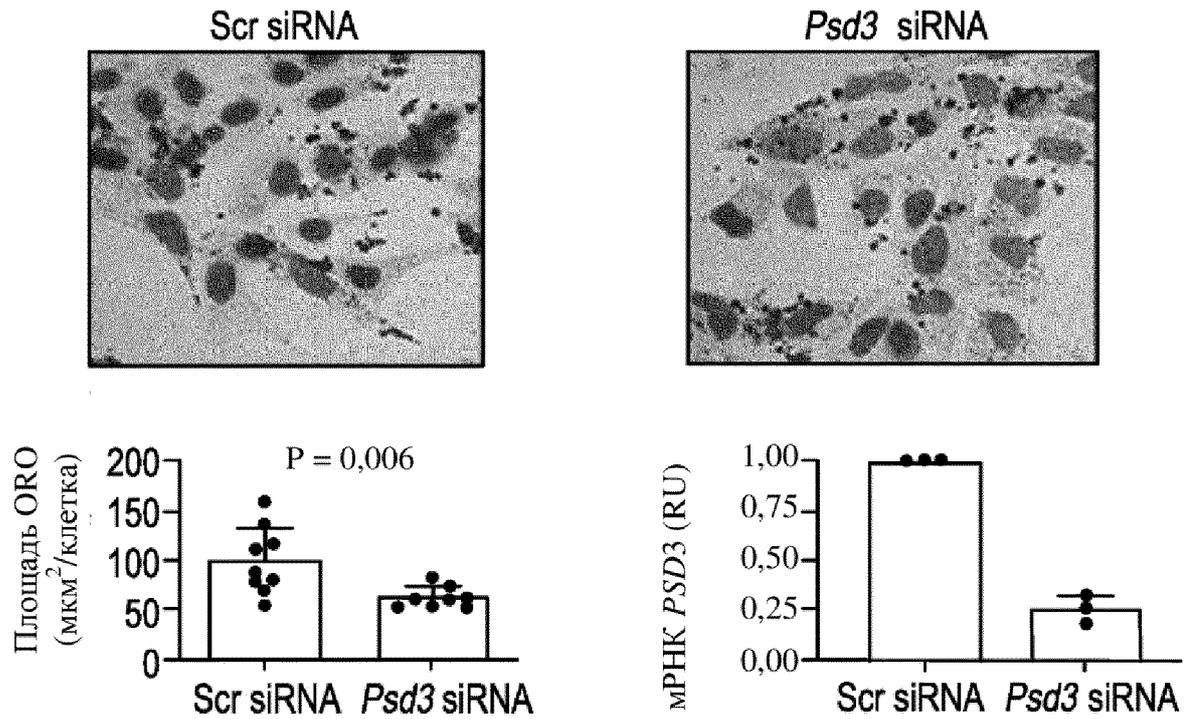


ФИГ. 9А

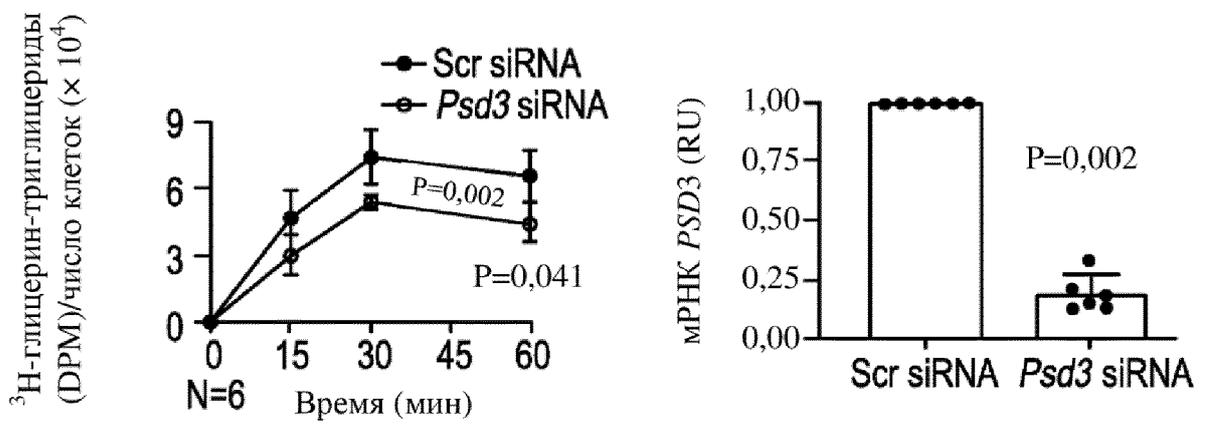


ФИГ. 9В

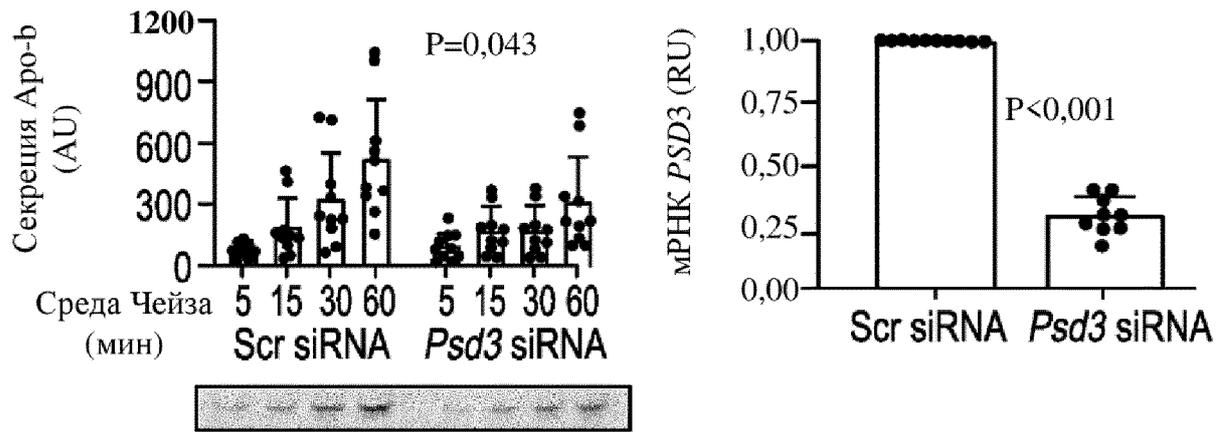
ФИГ. 9С



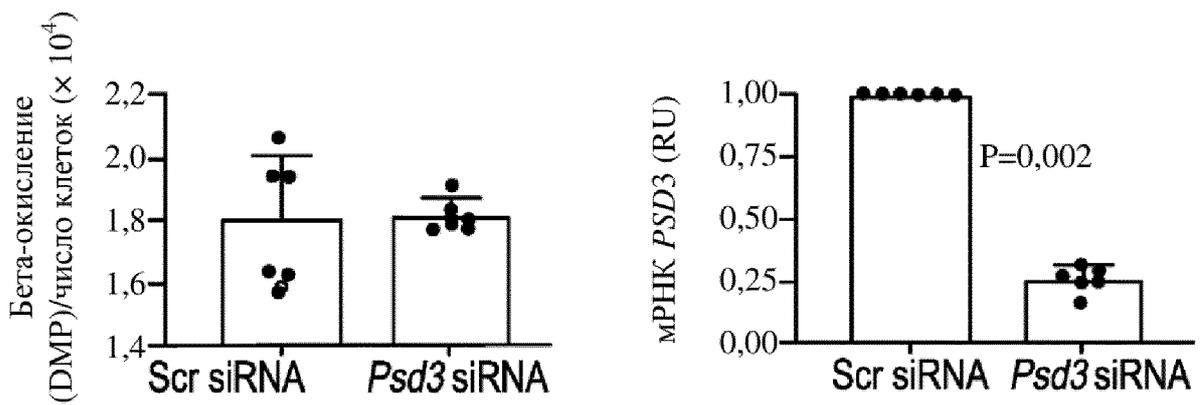
ФИГ. 10А



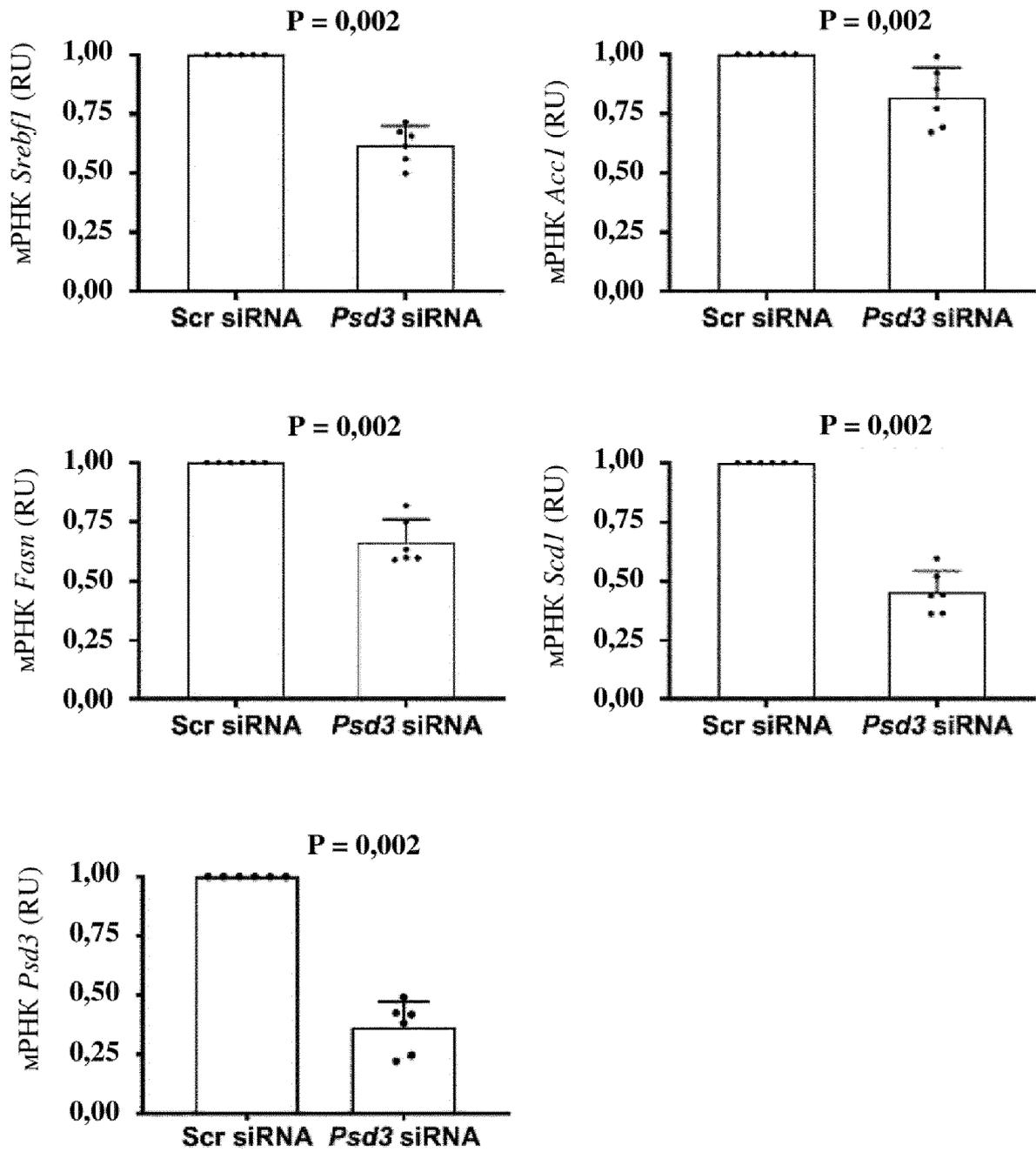
ФИГ. 10В



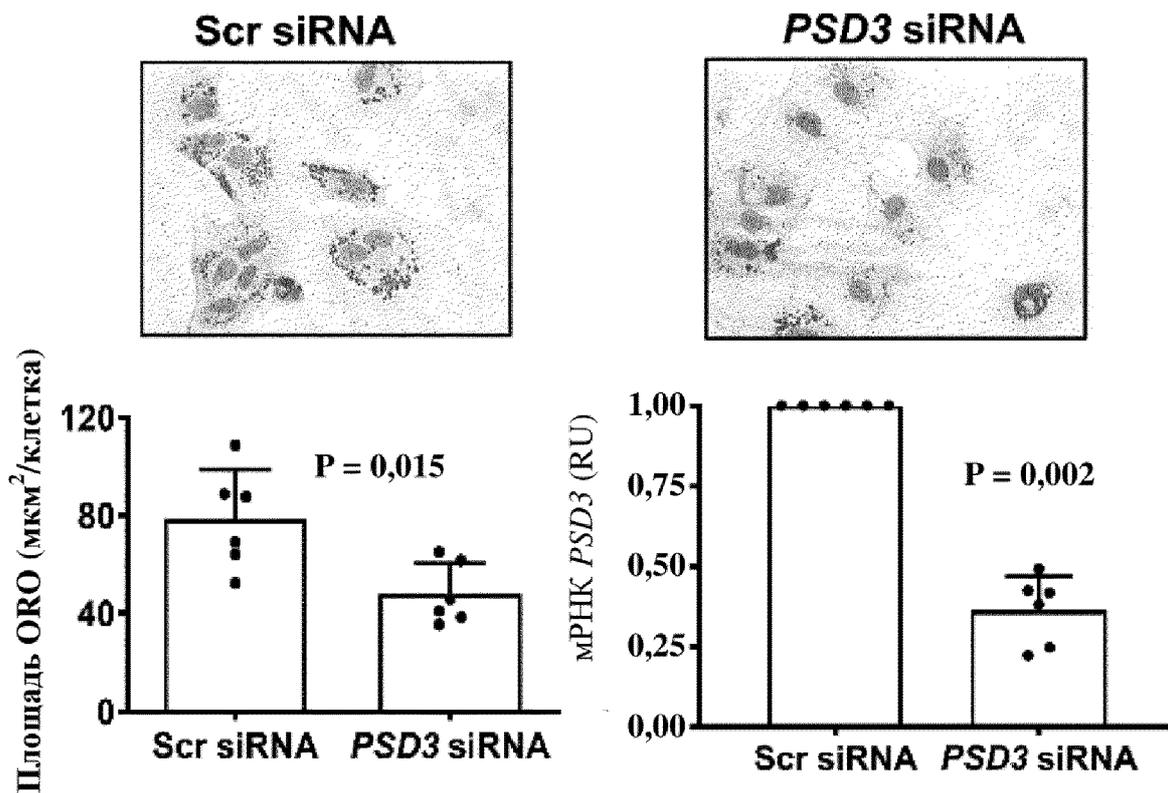
ФИГ. 10С



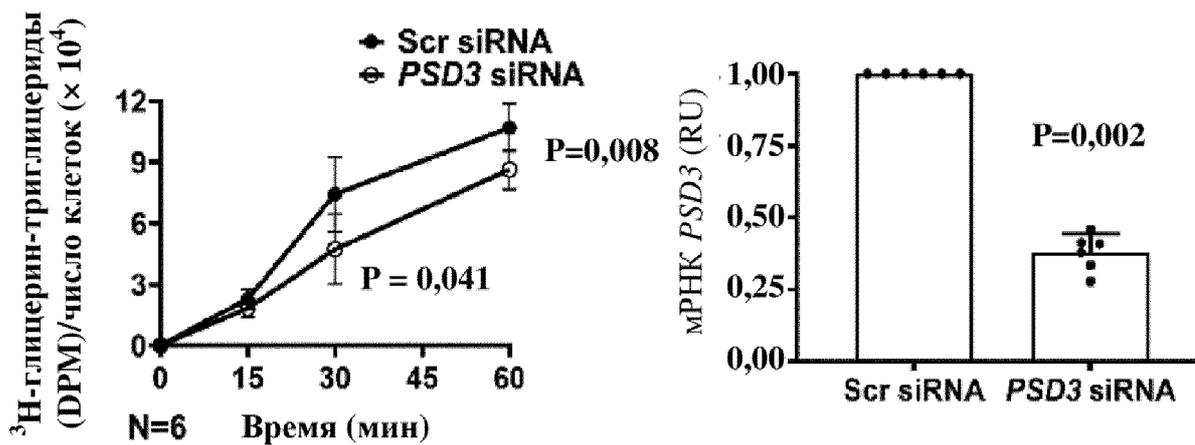
ФИГ. 10D



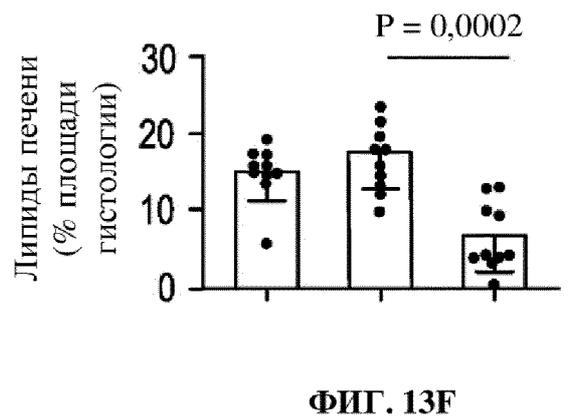
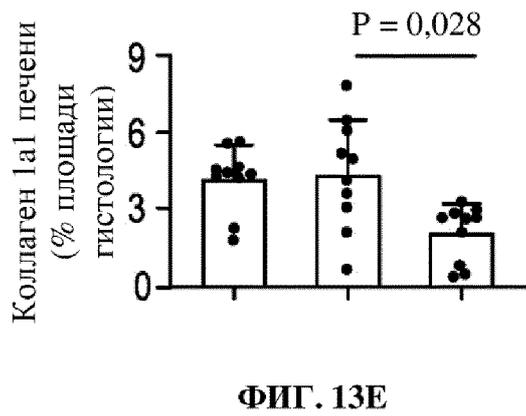
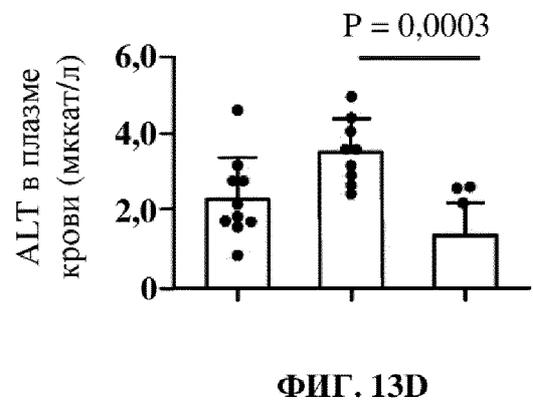
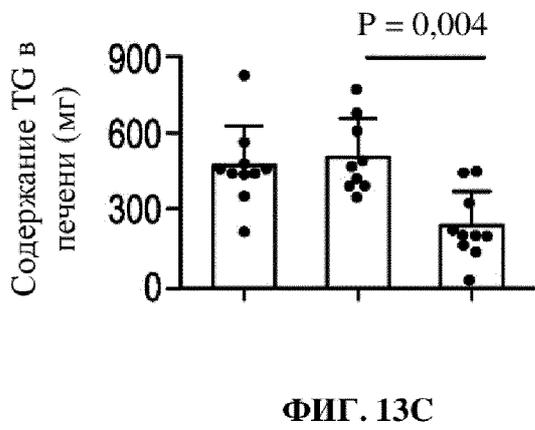
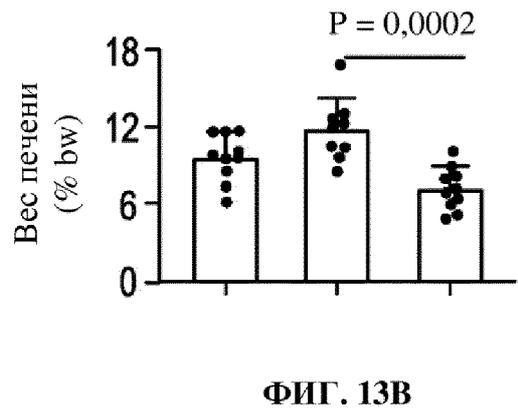
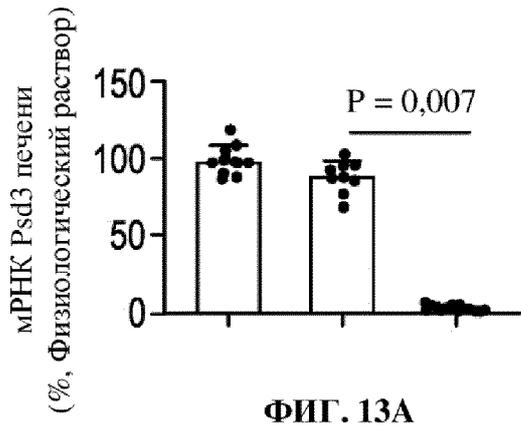
ФИГ. 11

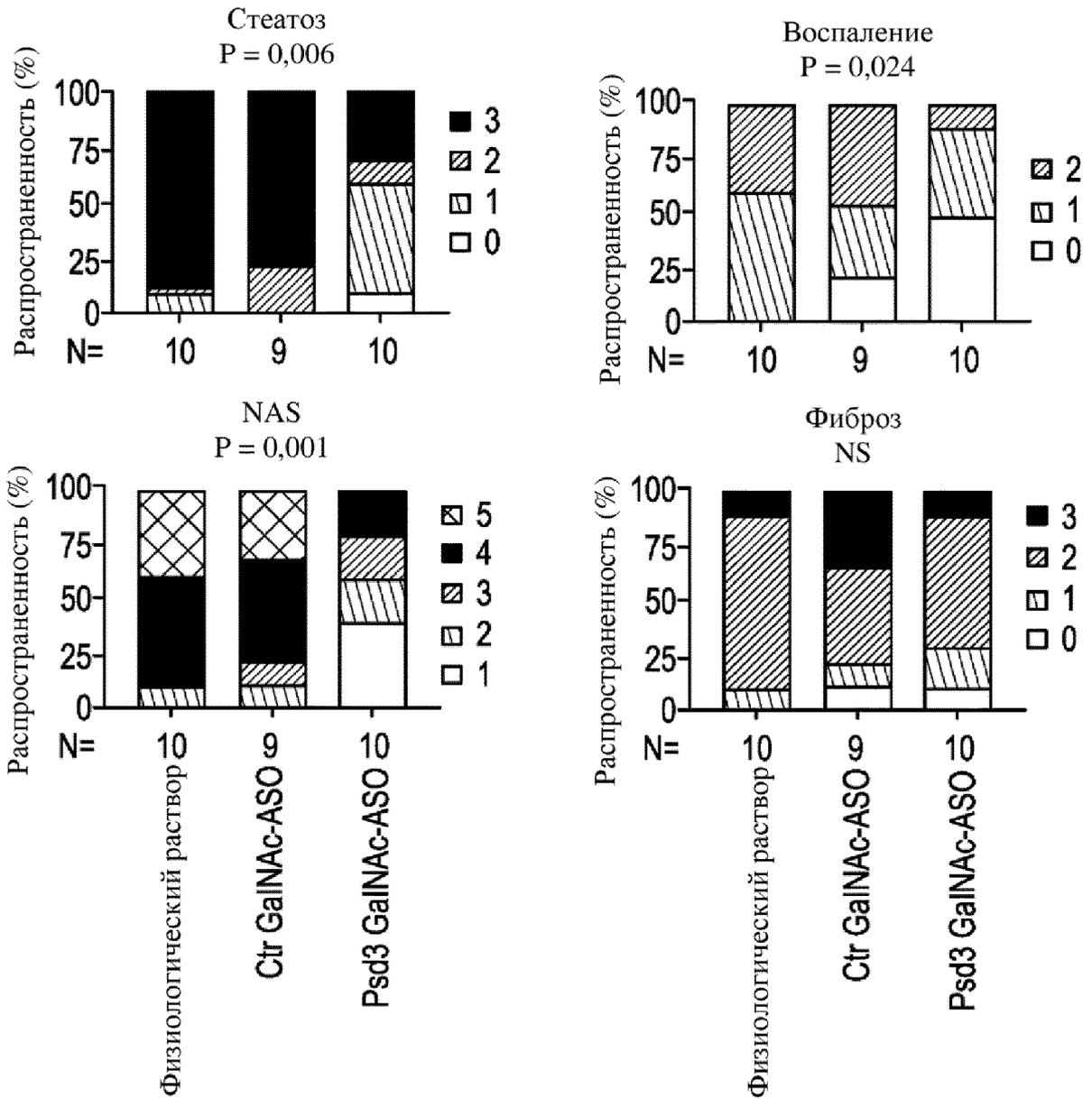


ФИГ. 12А

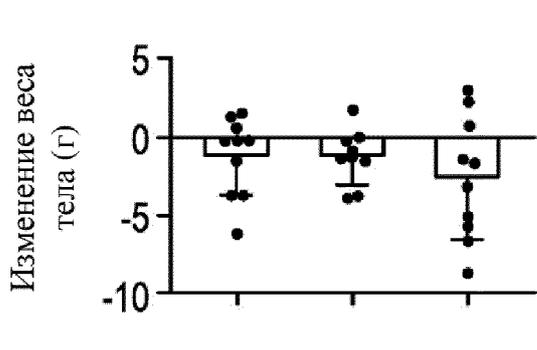


ФИГ. 12В

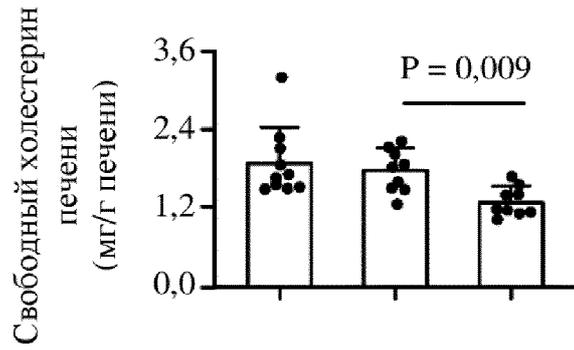




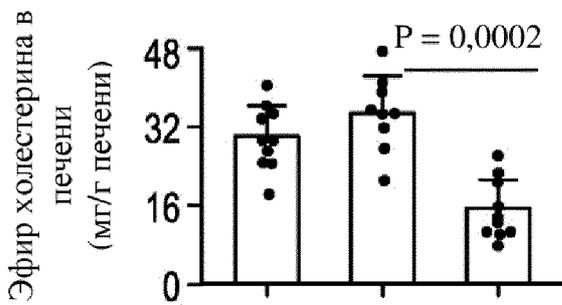
ФИГ. 13G



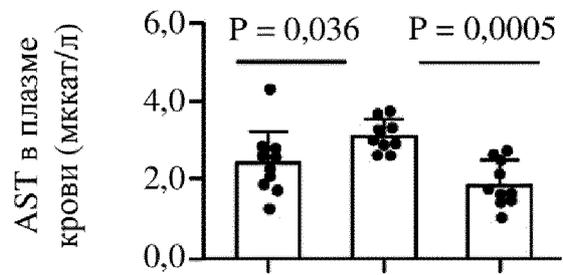
ФИГ. 14А



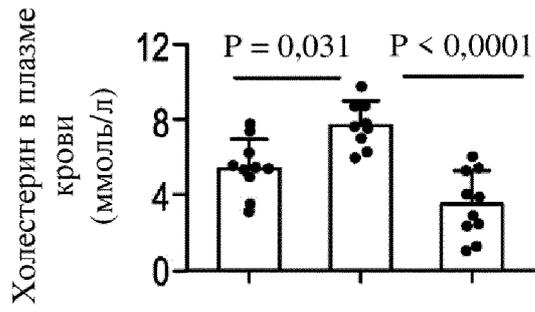
ФИГ. 14В



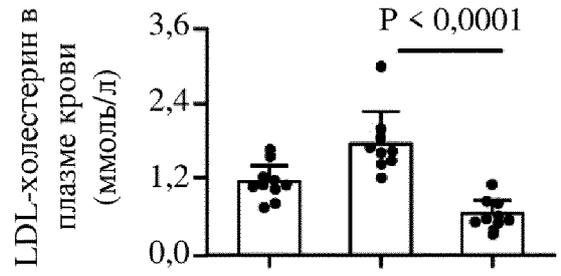
ФИГ. 14С



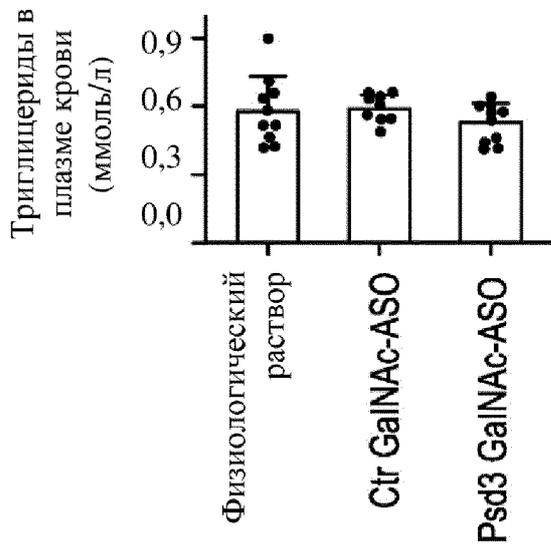
ФИГ. 14Д



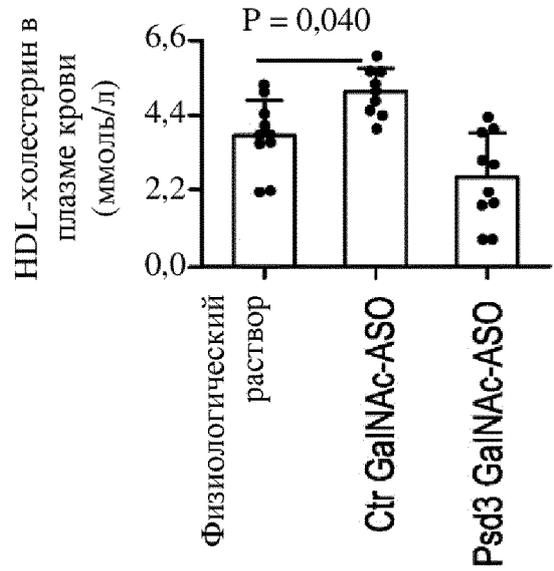
ФИГ. 14Е



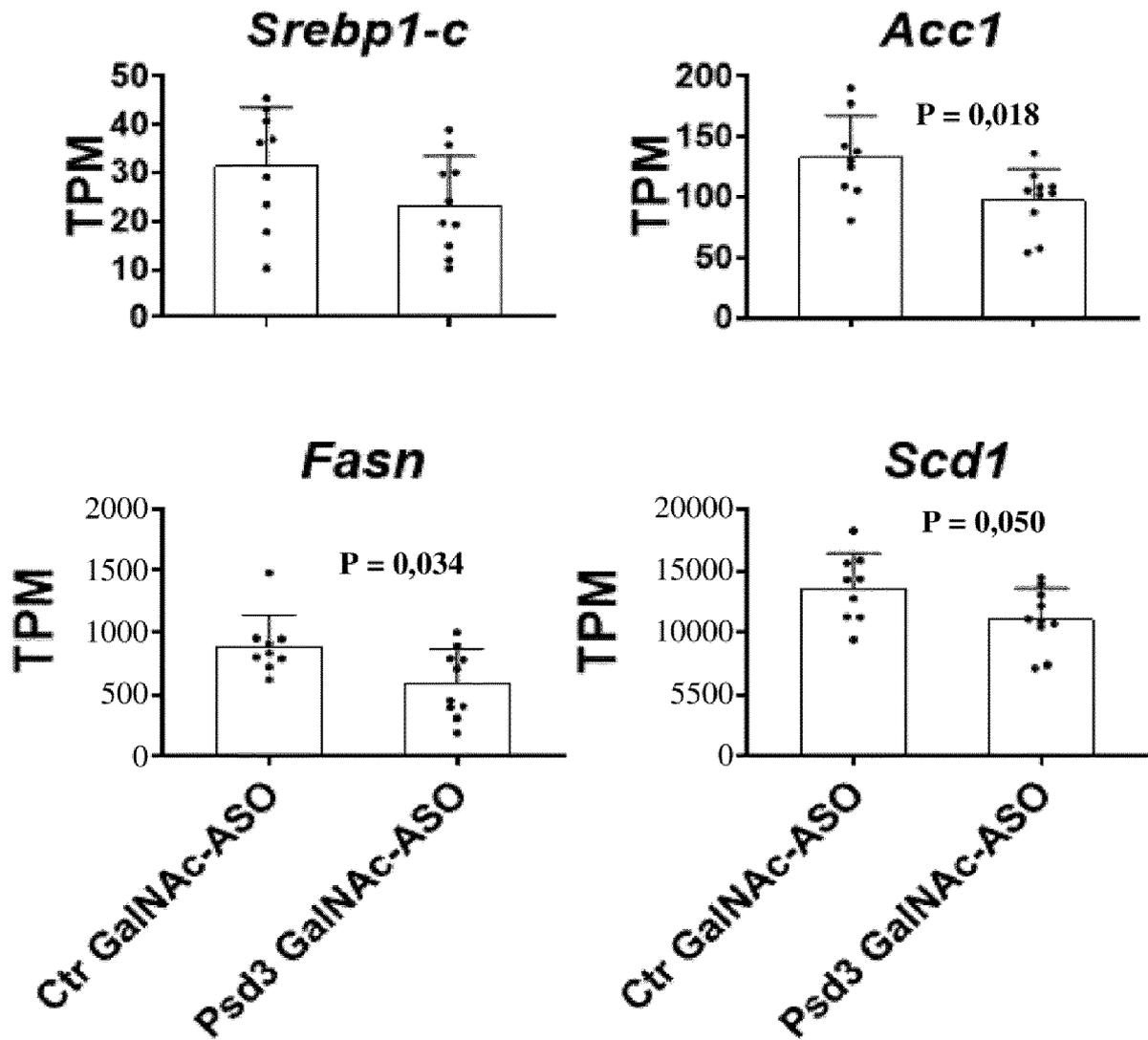
ФИГ. 14F



ФИГ. 14G



ФИГ. 14H



ФИГ. 15

	<i>P-значение</i>	OR	CI	
Тяжесть стеатоза	2,2E-06	0,74	0,65	0,84
Тяжесть фиброза	0,002	0,82	0,71	0,93
Тяжесть воспаления	2,3E-06	0,73	0,64	0,83
Тяжесть баллонирования*	0,003	0,79	0,68	0,92

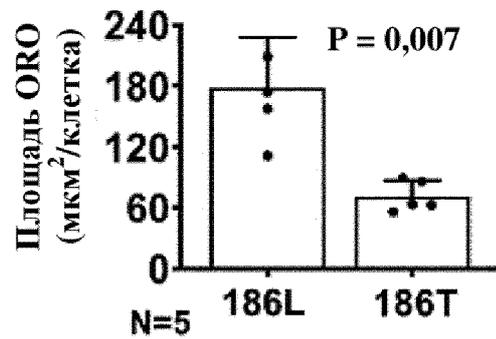
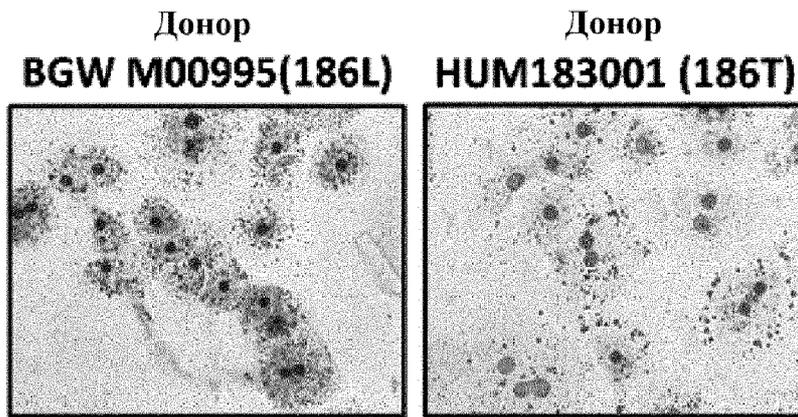
ФИГ. 16

Характеристика	186L	L186T	186T	P-значение
Все этносы				
N	1907	728	101	
Возраст, лет	45,6 ± 10,2	45,4 ± 10,4	47,5 ± 9,5	0,59
Женщины, п (%)	1077 (56,48)	403 (55,36)	53 (52,48)	0,67
BMI, кг/м ²	30,2 ± 6,8	30,2 ± 6,6	28,1 ± 6,1	0,49
ТС, мг/дл	184,5 ± 40,9	184,2 ± 36,6	182,1 ± 39,1	0,18
LDL, мг/дл	109,7 ± 37,1	109 ± 33,9	108,9 ± 34,1	0,39
HDL, мг/дл	51 ± 14,9	49,8 ± 14,8	50,4 ± 15,4	0,69
TG, мг/дл	96 (68 - 144)	104 (73 - 155)	101 (72 - 140)	0,32
HTGC, %	3,49 (1,97 - 6,78)	3,74 (1,95 - 7,5)	3,01 (1,43 - 7,29)	0,049
Афроамериканцы				
N	1096	224	8	
Возраст, лет	46,5 ± 10,1	45,8 ± 10,5	49,1 ± 11,7	0,52
Женщины, п (%)	642 (58,58)	142 (63,39)	3 (37,5)	0,19
BMI, кг/м ²	30,9 ± 7,2	31,9 ± 7,6	33,1 ± 7,9	0,072
ТС, мг/дл	182,8 ± 41,2	181,9 ± 38,3	196,4 ± 42	0,78
LDL, мг/дл	109,4 ± 38,4	107,4 ± 36	120,8 ± 47,1	0,66
HDL, мг/дл	53 ± 15,5	53,4 ± 14,8	54,9 ± 29,1	0,41
TG, мг/дл	86 (63 - 121)	84 (66 - 128)	95 (78 - 136)	0,43
HTGC, %	3,2 (1,78 - 5,43)	3,1 (1,7 - 5,08)	5,39 (1,85 - 10,91)	0,57
Американцы европейского происхождения				
N	457	344	81	
Возраст, лет	46,7 ± 10,5	46,9 ± 10,1	47,3 ± 9,4	0,66
Женщины, п (%)	236 (51,64)	170 (49,42)	45 (55,56)	0,58
BMI, кг/м ²	28,6 ± 5,8	29,4 ± 6,1	27,7 ± 5,9	0,99
ТС, мг/дл	189,9 ± 39,5	186,2 ± 35,7	179,2 ± 38,4	0,012
LDL, мг/дл	112,5 ± 36	110,7 ± 33,9	106,8 ± 32,3	0,20
HDL, мг/дл	50,1 ± 15,1	48,8 ± 15,4	49,6 ± 13,6	0,25
TG, мг/дл	113 (75 - 173)	112 (79 - 164)	101 (70 - 145)	0,11
HTGC, %	3,64 (2,09 - 7,42)	3,83 (2,02 - 7,98)	2,64 (1,28 - 5,51)	0,073
Люди испанского происхождения				
N	308	149	8	
Возраст, лет	41 ± 8,8	41,3 ± 9,5	49,6 ± 9,4	0,16
Женщины, п (%)	184 (59,74)	86 (57,72)	4 (50)	0,78
BMI, кг/м ²	30,4 ± 6,5	29,8 ± 5,5	28,5 ± 6	0,21
ТС, мг/дл	183,9 ± 42,2	183,8 ± 36	189,6 ± 35,9	0,95
LDL, мг/дл	108 ± 34,3	107,8 ± 30,8	109,8 ± 28,1	0,92
HDL, мг/дл	45,7 ± 10,9	47,5 ± 12,3	52,2 ± 16,8	0,054
TG, мг/дл	122 (81 - 183)	119 (82 - 170)	116 (86 - 176)	0,57
HTGC, %	5,28 (2,7 - 12,54)	4,43 (2,36 - 9,92)	8,65 (4,35 - 12,36)	0,32

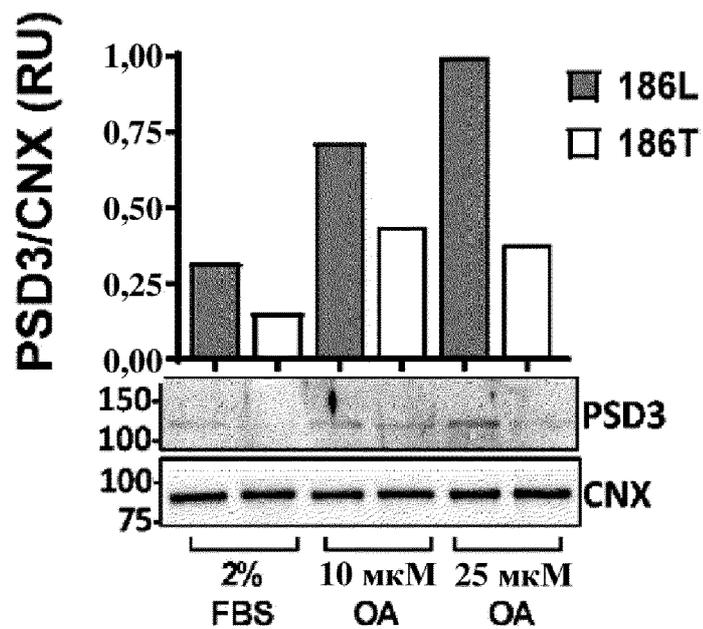
ФИГ.17

rs7003060									
	GG		GT		TT				
	N	Медианное значение (IQR)	N	Медианное значение (IQR)	N	Медианное значение (IQR)	<i>P-значение</i>	<i>Beta</i>	CI
Все участники	5243	2,92 (2,78)	4668	2,84 (2,71)	1059	2,86 (2,67)	0,49	-0,00892	[-0,034, 0,016]
BMI < 25	2137	2,18 (1,5)	1907	2,19 (1,40)	442	2,22 (1,36)	0,77	-0,00636	[-0,048, 0,035]
25 ≤ BMI < 30	2294	3,32 (2,94)	2019	3,29 (3,10)	433	3,31 (2,85)	0,66	0,00975	[-0,033, 0,052]
30 ≤ BMI < 35	651	4,86 (6,03)	568	4,25 (4,87)	143	4,72 (6,67)	0,18	-0,0534	[-0,13, 0,025]
BMI ≥ 35	156	6,37 (8,8)	165	5,14 (8,04)	39	5,60 (7,47)	0,02	-0,175	[-0,33, -0,022]

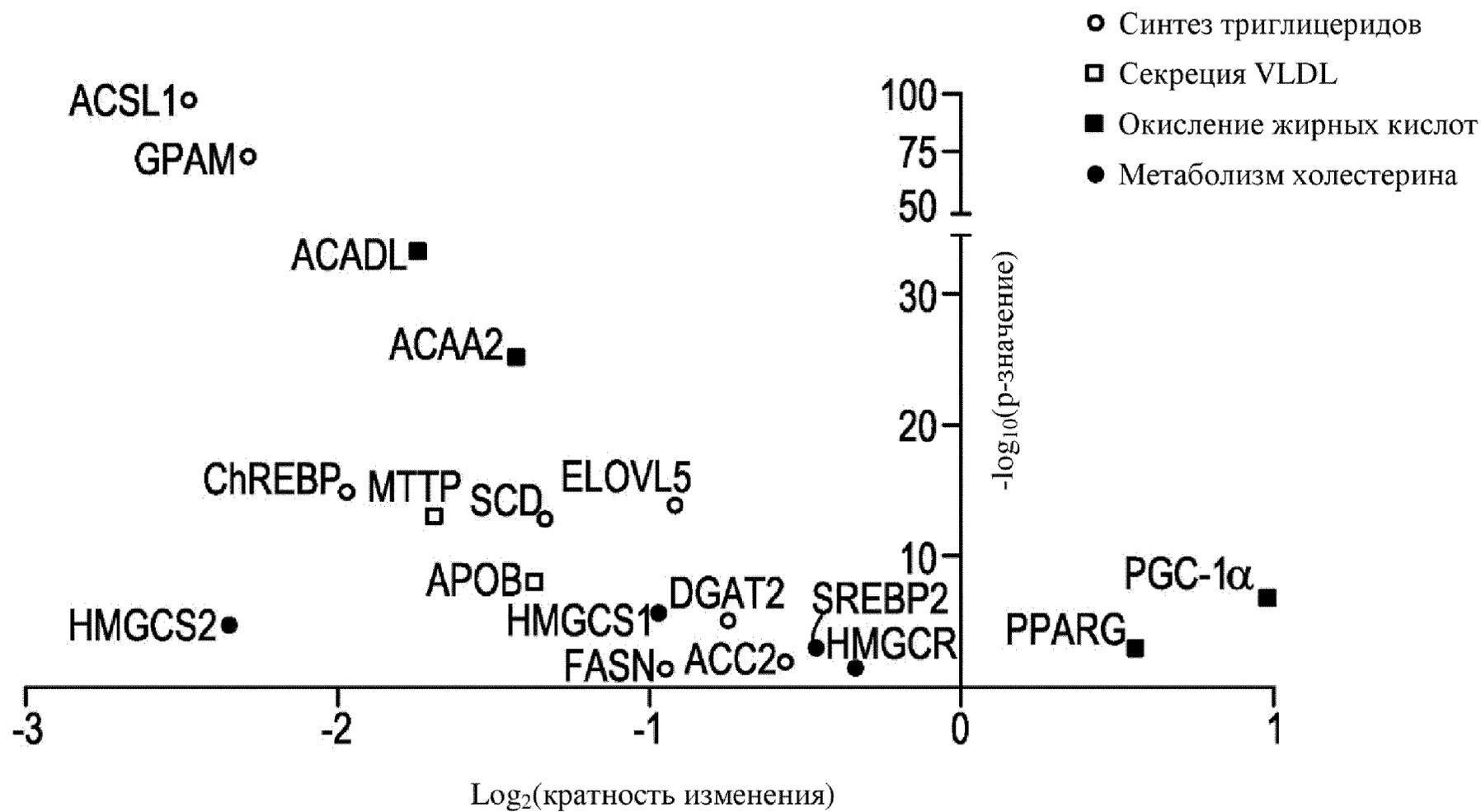
ФИГ. 18



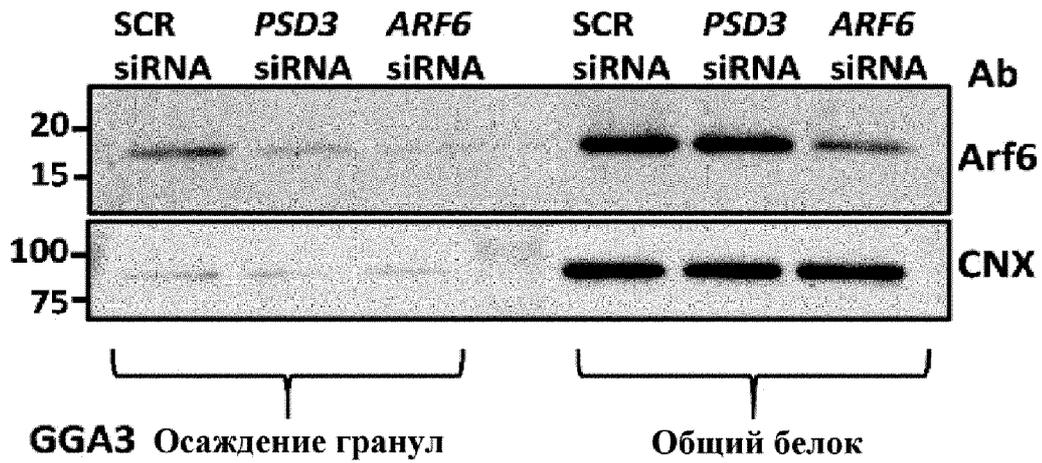
ФИГ. 19А



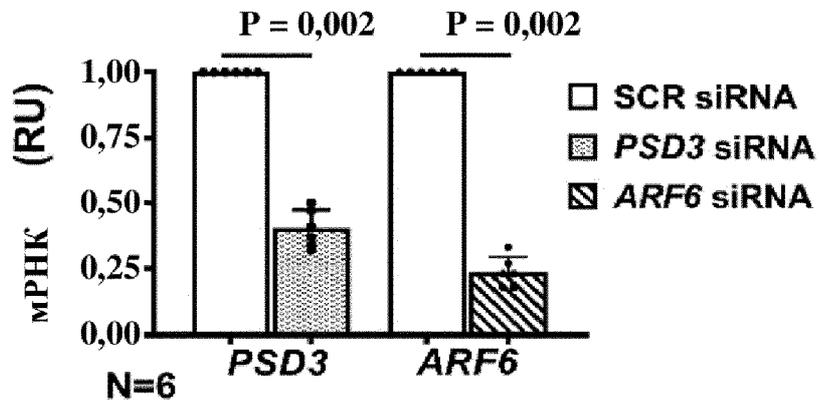
ФИГ. 19В



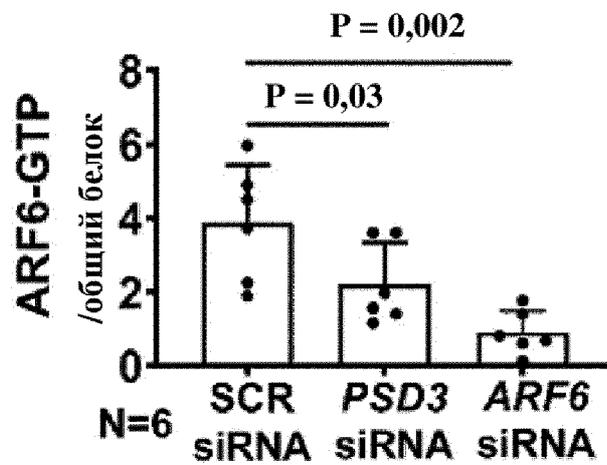
ФИГ. 19С



ФИГ. 20А



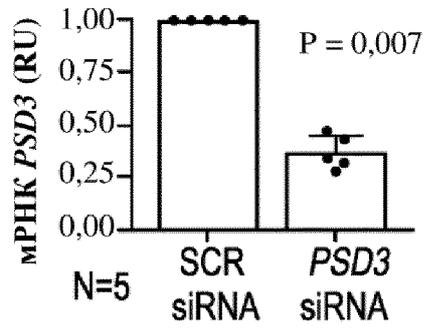
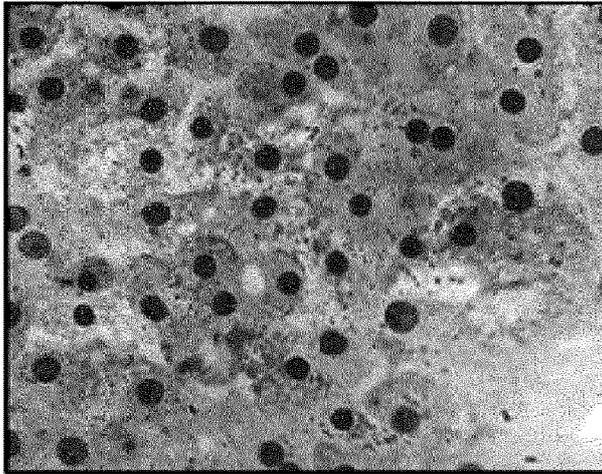
ФИГ. 20В



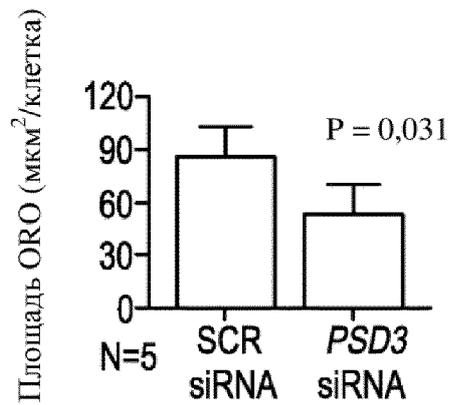
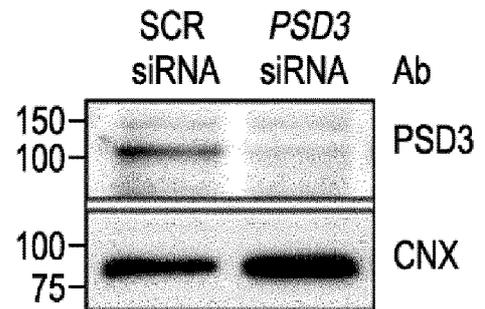
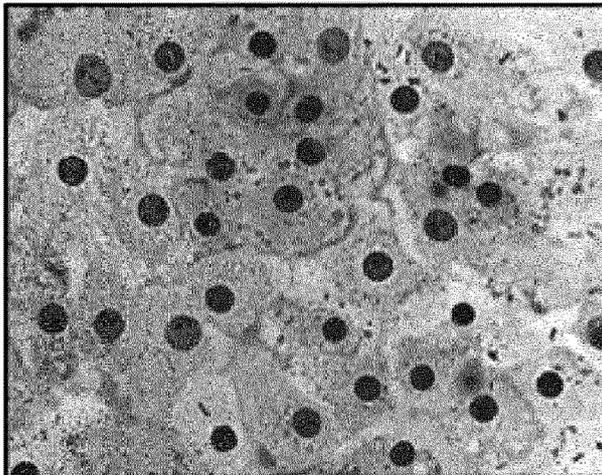
ФИГ. 20С

186L

SCR siRNA



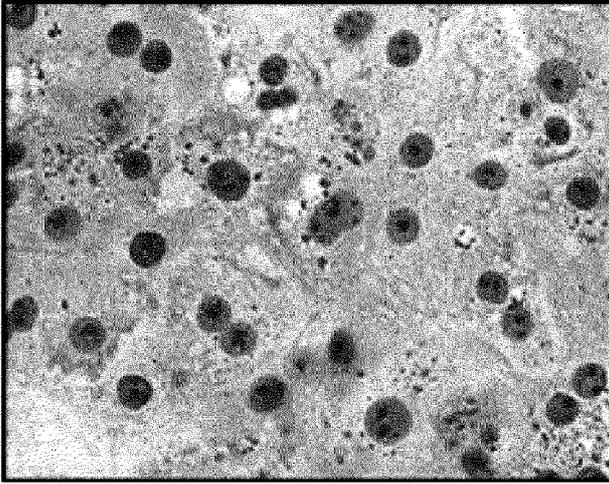
PSD3 siRNA



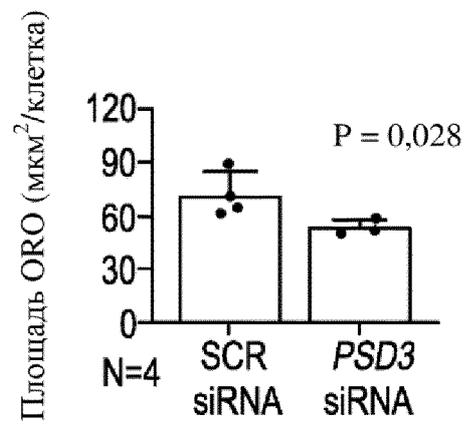
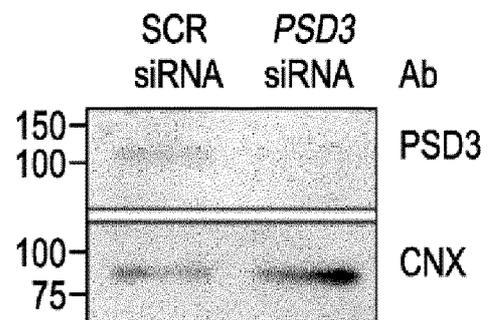
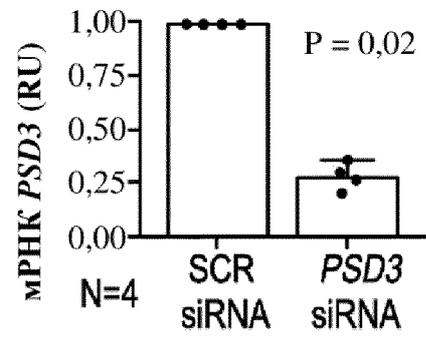
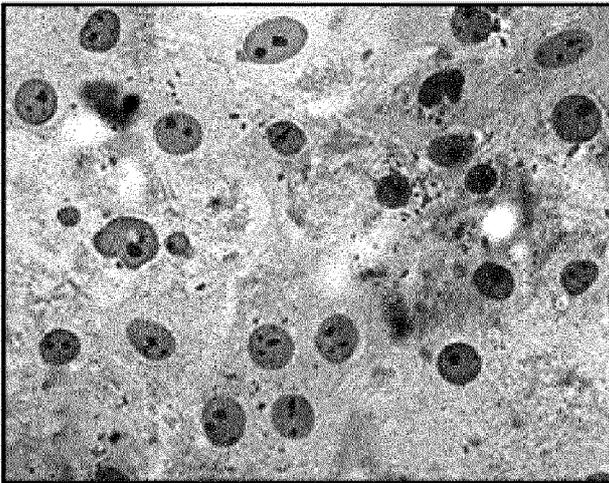
ФИГ. 21А

186T

SCR siRNA



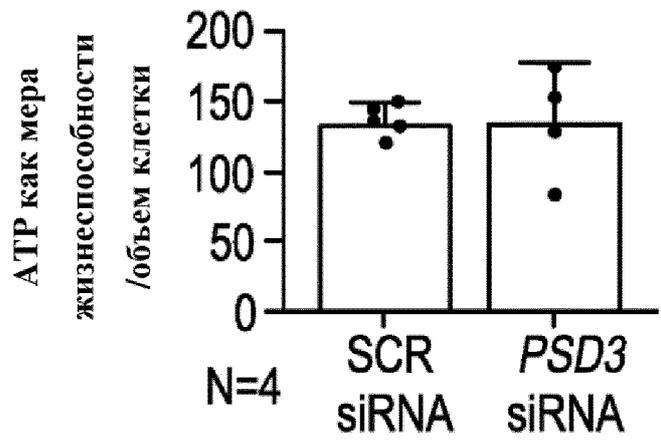
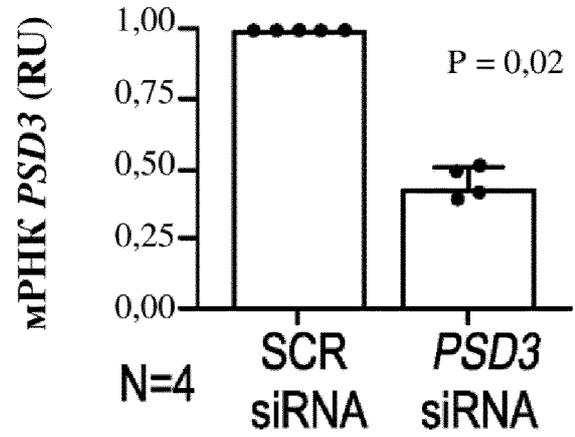
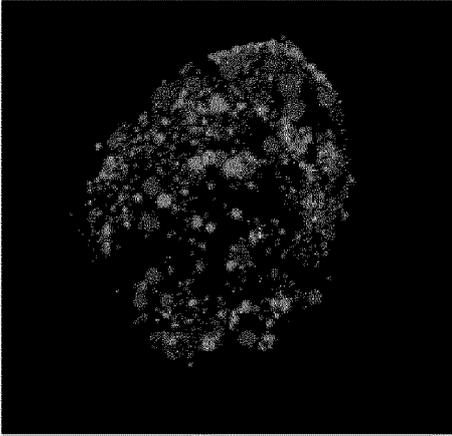
PSD3 siRNA



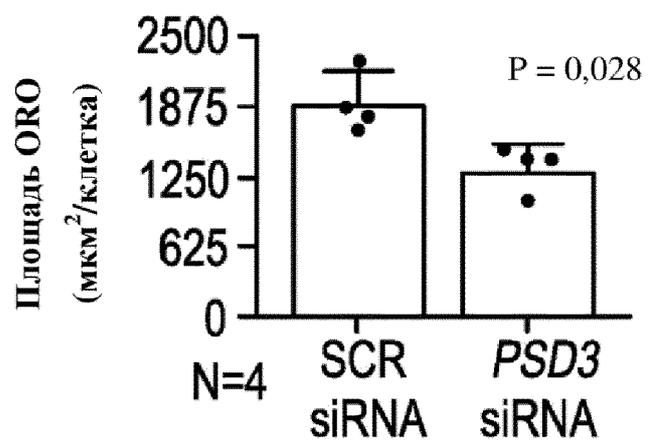
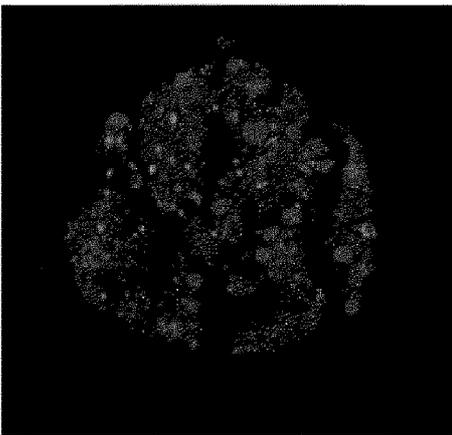
ФИГ. 21В

186L

SCR siRNA



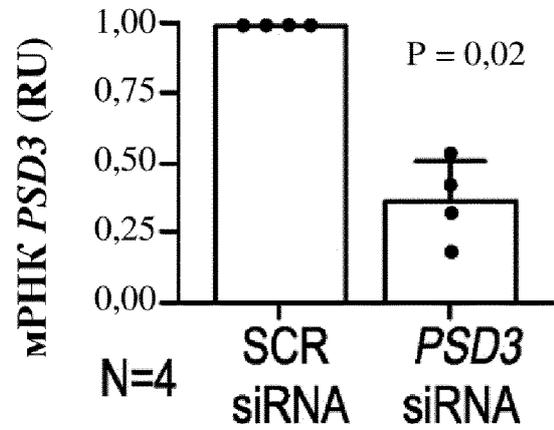
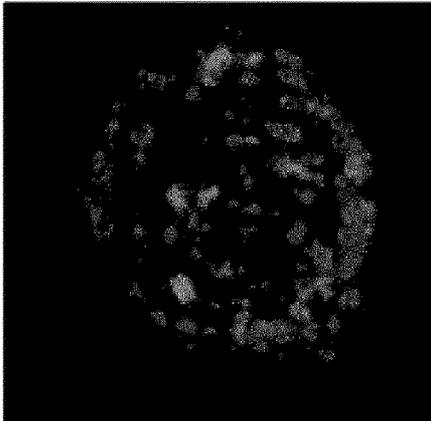
PSD3 siRNA



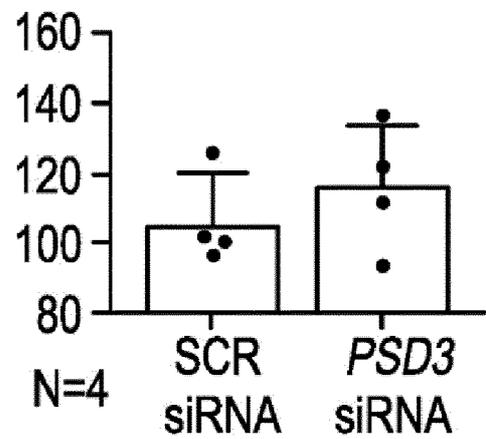
ФИГ. 21С

186T

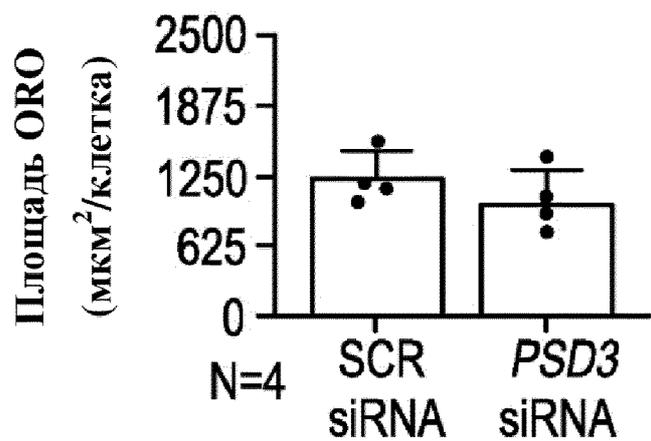
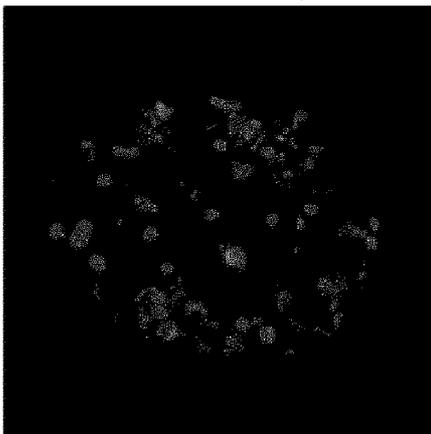
SCR siRNA



АТР как мера
жизнеспособности
/объем клетки



PSD3 siRNA



ФИГ. 21D

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 201089-WO-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2021/075952	International filing date (<i>day/month/year</i>) 21 September 2021 (21-09-2021)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 22 September 2020 (22-09-2020)
Applicant ASTRAZENECA AB		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/075952

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/075952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANSBY EMMELIE ET AL.: "Targeted delivery of Stk25 antisense oligonucleotides to hepatocytes protects mice against nonalcoholic fatty liver disease", CMGH CELLULAR AND MOLECULAR GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 7, no. 3, 1 January 2019 (2019-01-01), pages 597-618, XP55892655, ISSN: 2352-345X, DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.12.004	15,16
A	page 601 the whole document	1-14, 17, 18
X	US 2018/214578 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 2 August 2018 (2018-08-02)	15,16
A	the whole document	1-14, 17, 18
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 February 2022	Date of mailing of the international search report 11/03/2022
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Macchia, Giovanni
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/075952

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nuñez Durán Esther ET AL.: "Serine/Threonine Protein Kinase 25 antisense oligonucleotide treatment reverses glucose intolerance, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease in mice", Hepatology Communications, vol. 2, no. 1 1 January 2018 (2018-01-01), XP55892663, DOI: 10.1002/hep4.1128/full Retrieved from the Internet: URL:https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley. com/doi/10.1002/hep4.1128 [retrieved on 2022-02-16]	15,16
A	the whole document	1-14,17, 18

X	ZHAO YING-PENG ET AL.: "LXR[alpha] gene downregulation by lentiviral-based RNA interference enhances liver function after fatty liver transplantation in rats", HEPATOBIILIARY & PANCREATIC DISEASES INTERNATIONAL, vol. 14, no. 4, 10 March 2015 (2015-03-10) , pages 386-393, XP55892651, CN ISSN: 1499-3872, DOI: 10.1016/S1499-3872(15)60347-2	15,16
A	the whole document	1-14,17, 18

X	MORRAL N. ET AL.: "Inhibition of hepatic de novo lipogenesis to reduce fatty liver: effects of SREBP-1 gene silencing", JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 56, 2012, pages S494-S495, XP028912296, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/S0168-8278(12)61262-8	15,16
A	the whole document	1-14,17, 18

X	WO 2011/141703 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC. [CA]) 17 November 2011 (2011-11-17)	17,18
A	the whole document	1-16

-/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2021/075952

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>MANCINA ROSELLINA M. ET AL.: "PSD3 downregulation confers protection against fatty liver disease", NATURE METABOLISM, vol. 4, no. 1, 1 January 2022 (2022-01-01) , pages 60-75, XP55892685, DOI: 10.1038/s42255-021-00518-0 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s42255-021-00518-0 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/075952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018214578 A1	02-08-2018	CN 107921150 A	17-04-2018
		JP 6524351 B2	05-06-2019
		JP 2018522947 A	16-08-2018
		KR 20170014910 A	08-02-2017
		US 2018214578 A1	02-08-2018
		US 2019307902 A1	10-10-2019
		WO 2017023001 A1	09-02-2017

WO 2011141703 A1	17-11-2011	US 2013123339 A1	16-05-2013
		WO 2011141703 A1	17-11-2011
