

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491889** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.25

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.23

(54) **КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА LPA (ARO(A))**

(31) PCT/CN2022/073415

(32) 2022.01.24

(33) CN

(86) PCT/CN2023/073456

(87) WO 2023/138689 2023.07.27

(71) Заявитель:

**ШАНХАЙ АРГО
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(CN)**

(72) Изобретатель:

**Шу Дунсюй (CN), Шао Пэнчэн
Патрик (US), Ся Шивэй (CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены композиция и способ, применимые для снижения экспрессии гена LPA (Apo(a)) и для лечения связанных с LPA заболеваний и состояний. Дополнительно предусмотрены средство на основе dsRNA LPA, средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, композиция, содержащая средство на основе dsRNA LPA, и композиция, содержащая средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, которые применимы для снижения экспрессии LPA в клетке и в организме субъекта.

A1

202491889

202491889

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581266EA/022

КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА LPA (APO(A))

Область техники

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к композициям и способам, которые могут быть использованы для подавления экспрессии белка LPA (Apo(a)).

Предпосылки изобретения

Частицы Lp(a) представляют собой гетерогенные частицы липопротеинов низкой плотности, экспрессируемых преимущественно в печени (Witztum and Ginsberg, J Lipid Res. March 2016; 57 (3): 336- 9). Они состоят из аполипопротеина (a) (Apo(a) или Lp(a) кодируется геном LPA), связанного с LDL-подобными частицами посредством полипептида ApoB. Генетически определенные высокие уровни частиц Lp (a) в сыворотке крови не зависят от рациона и физических упражнений и ассоциированы с повышенным риском развития сердечно-сосудистого заболевания по причине ассоциированного с ним атеросклеротического потенциала (Alonso et al., Journal of the American College of Cardiology Vol. 63, No. 19, 2014). По данным диагностической и профилактической медицины, уровни частиц Lp(a) в сыворотке крови пациентов являются широко распространенным независимым генетическим фактором риска развития ишемической болезни сердца и аортального стеноза (Saeedi and Frohlich Clinical Diabetes and Endocrinology (2016) 2: 7). Результаты анализа уровней Lp(a) в многочисленных исследованиях позволяют предположить, что высокий уровень Lp(a) является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистого заболевания, инсульта и других связанных с ними состояний, в том числе атеросклеротического стеноза. Кроме того, результаты полногеномных ассоциативных анализов также позволили идентифицировать LPA как генетический фактор риска развития таких заболеваний, как атеросклеротический стеноз. У пациентов с гиперлипидемией при одновременном снижении уровней Lp(a) и LDL с применением терапевтического липопротеинового гематокатарсиса обнаружено значительное снижение количества сердечно-сосудистых явлений. Следовательно, требуются терапевтические средства и средства лечения, ассоциированные с этими и другими связанными с LPA заболеваниями.

Однако, за исключением непрямых стандартных общих мер по снижению LDL, в настоящее время не существует утвержденных конкретных средств терапии для снижения уровня частиц Lp(a). Таким образом, в настоящее время существует потребность в способах эффективного лечения, предупреждения и снижения риска возникновения следующего и состояний, связанных со следующим: болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарная болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальная регургитация, расслоение аорты, окклюзия артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз,

окклюзия верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильная/нестабильная стенокардия, острый коронарный синдром, гетерозиготная или гомозиготная семейная гиперхолестеринемия, гиперapoлипопротеинбетаалипопротеинемия, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц, и другие связанные с ними состояния, патологии или синдромы, которые еще не были идентифицированы. Настоящее изобретение направлено на решение данной неудовлетворенной медицинской потребности.

Сущность изобретения

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрено средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), которое подавляет экспрессию LPA (Apo(a)), при этом средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить и необязательно содержит нацеливающий лиганд. Область, комплементарная РНК-транскрипту LPA, включена в нуклеотидные положения 2-18 в антисмысловой нити, где комплементарная область содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, которые отличаются на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от одной из антисмысловых последовательностей, указанных в таблицах 1-3. В некоторых вариантах осуществления область, комплементарная РНК-транскрипту LPA, содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 последовательных нуклеотидов, которые отличаются на не более чем 3 нуклеотида от одной из антисмысловых последовательностей, указанных в таблицах 1-3. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить dsRNA в по меньшей мере значительной степени комплементарна любой целевой области mRNA гена LPA человека и представлена в одной из таблиц 1-3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить dsRNA полностью комплементарна любой целевой области mRNA гена LPA человека и представлена в одной из таблиц 1-3. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей смысловой нити, указанных в таблицах 1-3, где последовательности смысловой нити в по меньшей мере значительной степени комплементарны последовательностям антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей смысловой нити, указанных в таблицах 1-3, где последовательности смысловой нити по меньшей мере полностью комплементарны последовательностям антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей антисмысловой нити, указанных в таблицах 1-3. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит любую из последовательностей, указанных в качестве дуплексных последовательностей в таблицах 1-3. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить, которая отличается от формулы (A) на 0, 1, 2

или 3 нуклеотида: 5'-Z₁GUUAUCGAGGCACAUAZ₂-3', формула (A), где Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 0-15 нуклеотидных мотивов, и Z₂ выбран из одного из A, U, C и G или отсутствует. В определенных вариантах осуществления Z₂ представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₁ выбрана из одного из следующих мотивов: A, AA, UA, GA, CA, AGA, UGA, GGA, CGA, UAGA, CAGA, AAGA, ACAGA, GACAGA, GGACAGA, UGGACAGA, AUGGACAGA, AAUGGACAGA, UAAUGGACAGA, GUAAUGGACAGA, GGUAAUGGACAGA, UGGUAAUGGACAGA И AUGGUAAUGGACAGA или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Z₁ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 нуклеотидных мотива, выбранных из следующих мотивов: A, AA, UA, GA, CA, AGA, UGA, GGA, CGA, UAGA, CAGA, AAGA И ACAGA. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит антисмысловую нить, которая отличается от формулы (B) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида: 5'-Z₃UAUGUGCCUCGAUAACZ₄-3', формула (B), где Z₃ выбран из одного из A, U, C и G или отсутствует, Z₄ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 0-15 нуклеотидных мотивов. В определенных вариантах осуществления Z₃ представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₄ выбрана из одного из следующих мотивов: U, UU, UA, UC, UG, UCU, UCA, UCC, UCG, UCUC, UCUA, UCUG, UCUU, UCUGU, UCUGUC, UCUCUU, UCUCGA, UCUGUCC, UCUGUCCA, UCUGUCCAУ, UCUGUCCAУ, UCUGUCCAУUA, UCUGUCCAУUAC, UCUGUCCAУUACC, UCUGUCCAУUACCA И UCUGUCCAУUACCAУ или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Z₄ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 нуклеотидных мотива, выбранных из следующих мотивов: U, UU, UA, UC, UG, UCU, UCA, UCC, UCG, UCUC, UCUA, UCUG И UCUU. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, содержащие нуклеотидную последовательность, описанную в данном документе, которая отличается от формулы (A) и формулы (B) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида соответственно и необязательно содержит нацеливающий лиганд. В определенных вариантах осуществления длина каждой из смысловой нити (A) и антисмысловой нити (B) средства на основе dsRNA не превышает 35 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z₁ и Z₄ полностью или частично комплементарны. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z₂ и Z₃ полностью или частично комплементарны. В определенных вариантах осуществления смысловая нить комплементарна или в значительной степени комплементарна антисмысловой нити, и длина комплементарной области составляет от 16 до 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина комплементарной области составляет 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой нити не превышает 35 нуклеотидов, включая область, комплементарную антисмысловой нити, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить, которая отличается от формулы (C) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида: 5'-Z₅CCAAGCUUGGUCAUCUZ₆-3', формула (C), где Z₅ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 0-15 нуклеотидных мотивов, и Z₆ выбран из одного из A, U, C и G или отсутствует. В определенных вариантах осуществления Z₆ представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₅ выбрана из одного из следующих мотивов: G, AG, UG, GG, CG, AUG, UUG, GUG, CUG, UUUG, CUUG, AUUG, ACUUG, AACUUG, GAACUUG, AGAACUUG, AAGAACUUG, GAAGAACUUG, GGAAGAACUUG, AGGAAGAACUUG, CAGGAAGAACUUG, ACAGGAAGAACUUG и CACAGGAAGAACUUG или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Z₅ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 нуклеотидных мотива, выбранных из следующих мотивов: G, AG, UG, GG, CG, AUG, UUG, GUG, CUG, UUUG, CUUG и AUUG. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит антисмысловую нить, которая отличается от формулы (D) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида: 5'-Z₇AGAUGACCAAGCUUGGZ₈-3', формула (D), где Z₇ выбран из одного из A, U, C и G или отсутствует, Z₈ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 0-15 нуклеотидных мотивов. В определенных вариантах осуществления Z₇ представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₈ выбрана из следующих мотивов: C, CU, CA, CC, CG, CAU, CAA, CAC, CAG, CAAC, CAAA, CAAG, CAAU, CAAGU, CAAGUU, CAACUU, CAACGA, CAAGUUC, CAAGUUCU, CAAGUUCUU, CAAGUUCUUC, CAAGUUCUUCU, CAAGUUCUUCUCC, CAAGUUCUUCUCCU, CAAGUUCUUCUCCUG, CAAGUUCUUCUCCUGU и CAAGUUCUUCUCCUGUG или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Z₈ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 нуклеотидных мотива, выбранных из следующих мотивов: C, CU, CA, CC, CG, CAU, CAA, CAC, CAG, CAAC, CAAA, CAAG и CAAU. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, содержащие нуклеотидную последовательность, описанную в данном документе, которая отличается от формулы (C) и формулы (D) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида соответственно и необязательно содержит нацеливающий лиганд. В определенных вариантах осуществления длина каждой из смысловой нити (C) и антисмысловой нити (D) средства на основе dsRNA не превышает 35 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z₅ и Z₈ полностью или частично комплементарны. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z₆ и Z₇ полностью или частично комплементарны. В определенных вариантах осуществления смысловая нить комплементарна или в значительной степени комплементарна антисмысловой нити, и длина комплементарной области составляет от 16 до 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина комплементарной области составляет 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой нити не превышает 35 нуклеотидов, включая область, комплементарную

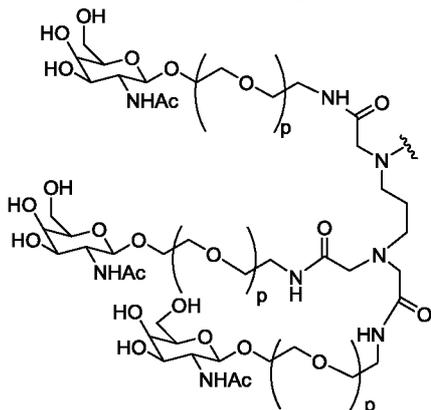
антисмысловой нити, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить, которая отличается от формулы (E) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида: 5'-Z₉GACAGAGUUAUCGAGGZ₁₀-3', формула (E), где Z₉ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 0-15 нуклеотидных мотивов, и Z₁₀ выбран из одного из A, U, C и G или отсутствует. В определенных вариантах осуществления Z₁₀ представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₉ выбрана из одного из следующих мотивов: G, AG, UG, GG, CG, AUG, UUG, GUG, CUG, CAUG, UAUG, GAUG, AAUG, UGAUG, GUGAUG, GGUGAUG, UGGUGAUG, AUGGUGAUG, CAUGGUGAUG, CCAUGGUGAUG, ACCAUGGUGAUG, UACCAUGGUGAUG, CUACCAUGGUGAUG И GCUACCAUGGUGAUG или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Z₉ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 нуклеотидных мотива, выбранных из следующих мотивов: G, AG, UG, GG, CG, AUG, UUG, GUG, CUG, CAUG, UAUG, GAUG И AAUG. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит антисмысловую нить, которая отличается от формулы (F) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида: 5'-Z₁₁CCUCGAUAACUCUGUCZ₁₂-3', формула (F), где Z₁₁ выбран из одного из A, U, C и G или отсутствует, Z₁₂ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 0-15 нуклеотидных мотивов. В определенных вариантах осуществления Z₁₁ представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность Z₁₂ выбрана из одного из следующих мотивов: C, CU, CA, CC, CG, CAU, CAA, CAC, CAG, CAUA, CAUG, CAUC, CAUU, CAUCA, CAUCAC, CAUGUU, CAUGGA, CAUCACC, CAUCACCA, CAUCACCAU, CAUCACCAUG, CAUCACCAUGG, CAUCACCAUGGU, CAUCACCAUGGUA, CAUCACCAUGGUAG И CAUCACCAUGGUAGC или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Z₁₂ представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 нуклеотидных мотива, выбранных из следующих мотивов: C, CU, CA, CC, CG, CAU, CAA, CAC, CAG, CAUA, CAUG, CAUC И CAUU. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, содержащие нуклеотидную последовательность, описанную в данном документе, которая отличается от формулы (E) и формулы (F) на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида соответственно и необязательно содержит нацеливающий лиганд. В определенных вариантах осуществления длина каждой из смысловой нити (E) и антисмысловой нити (F) средства на основе dsRNA не превышает 35 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z₉ и Z₁₂ полностью или частично комплементарны. В определенных вариантах осуществления нуклеотидные мотивы Z₁₀ и Z₁₁ полностью или частично комплементарны. В определенных вариантах осуществления смысловая нить комплементарна или в значительной степени комплементарна антисмысловой нити, и длина комплементарной области составляет от 16 до 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина комплементарной области составляет 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина

смысловой нити не превышает 35 нуклеотидов, включая область, комплементарную антисмысловой нити, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В определенных вариантах осуществления все или практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает 2'-О-метилнуклеотид, 2'-фторнуклеотид, 2'-дезоксинуклеотид, миметик 2',3'-секонуклеотида, закрытый нуклеотид, нуклеотид незамкнутой нуклеиновой кислоты (UNA), нуклеотид гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), 2'-F-арабинозный нуклеотид, 2'-метоксиэтилнуклеотид, нуклеотид без основания, рибит, обратный нуклеотид, обратный нуклеотид без основания, обратный 2'-ОМе-нуклеотид, обратный 2'-дезоксинуклеотид, 2'-аминомодифицированный нуклеотид, 2'-алкиломодифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид и 3'-ОМе-нуклеотид, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, или концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-аминомодифицированный нуклеотид, фосфорамидат или нуклеотид, содержащий неприродное основание. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 15 или более модифицированных нуклеотидов, независимо выбранных из 2'-О-метилнуклеотидов и 2'-фторнуклеотидов, где присутствует менее шести модифицированных нуклеотидов, представляющих собой 2'-фторнуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит три или пять 2'-фторнуклеотидов, предпочтительно антисмысловая нить содержит пять 2'-фторнуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 15 или более модифицированных нуклеотидов, независимо выбранных из 2'-О-метилнуклеотидов и 2'-фторнуклеотидов, где присутствует менее четырех модифицированных нуклеотидов, представляющих собой 2'-фторнуклеотиды. В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит три 2'-фторнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 15 или более модифицированных нуклеотидов, независимо выбранных из 2'-О-метилнуклеотидов и 2'-фторнуклеотидов, где по меньшей мере 16 модифицированных нуклеотидов представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды, и положения 2, 7, 12, 14 и/или 16 на 5'-конце антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, представляющими собой 2'-фторнуклеотиды (считая от первого спаренного нуклеотида на 5'-конце антисмысловой нити). В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 15 или более модифицированных нуклеотидов, независимо выбранных из 2'-О-метилнуклеотидов и 2'-фторнуклеотидов, где по меньшей мере 18 модифицированных нуклеотидов представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды, и положения 9, 11 и/или 13 на 3'-конце смысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, представляющими собой 2'-фторнуклеотиды (считая от первого спаренного нуклеотида 3'-конца смысловой

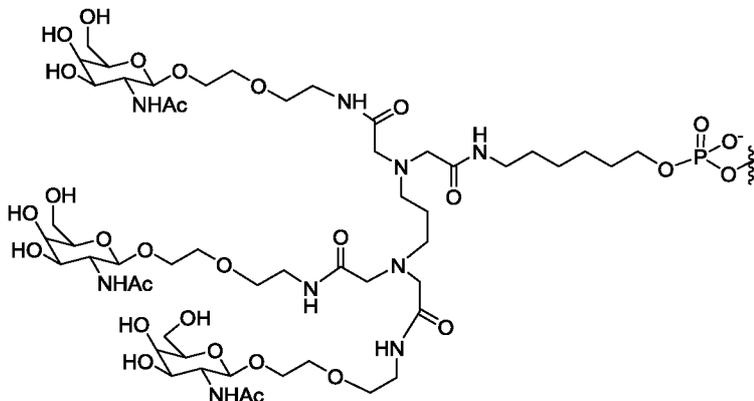
нити). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтормодифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12, 14 и 16 антисмысловой нити в направлении от 5'-конца к 3'-концу; считая от первого спаренного нуклеотида на 5'-конце антисмысловой нити, нуклеотиды в других положениях в каждой антисмысловой нити независимо представляют собой нуклеотиды, отличные от фтормодифицированных. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтормодифицированные нуклеотиды в положениях 2, 5, 12, 14 и 18 антисмысловой нити в направлении от 5'-конца к 3'-концу, считая от первого спаренного нуклеотида на 5'-конце антисмысловой нити, и каждый нуклеотид в другом положении в антисмысловой нити независимо представляет собой нуклеотид, отличный от фтормодифицированного. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 2'-фтормодифицированные нуклеотиды в нуклеотидных положениях 9, 11 и 13 смысловой нити в направлении от 3'-конца к 5'-концу, считая от первого спаренного нуклеотида на 3'-конце смысловой нити, и каждый нуклеотид в другом положении в смысловой нити независимо представляет собой нуклеотид, отличный от фтормодифицированного. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит E-винилфосфонатный нуклеотид на 5'-конце направляющей нити. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления все или практически все нуклеотиды смысловой и антисмысловой нитей являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная смысловая нить представляет собой модифицированную последовательность смысловой нити, указанную в таблицах 2-3. В некоторых вариантах осуществления модифицированная антисмысловая нить представляет собой модифицированную последовательность антисмысловой нити, указанную в таблицах 2-3. В определенных вариантах осуществления смысловая нить комплементарна или в значительной степени комплементарна антисмысловой нити, и длина комплементарной области составляет от 16 до 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина комплементарной области составляет 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина комплементарной области составляет 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не

более 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой нити составляет не более 23 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и дополнительно содержит одну или несколько нацеливающих групп или связывающих групп. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько нацеливающих групп или связывающих групп конъюгированы со смысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы или связывающие группы содержат N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления нацеливающие фрагменты нацеливающих групп содержат следующие структурные фрагменты:

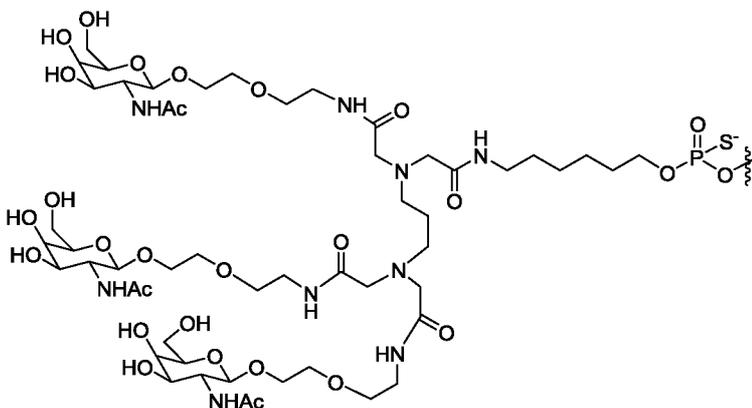


p равняется 1 или 2.

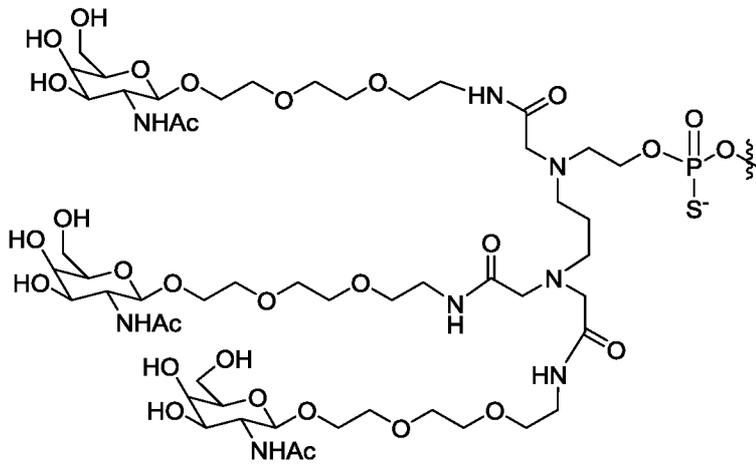
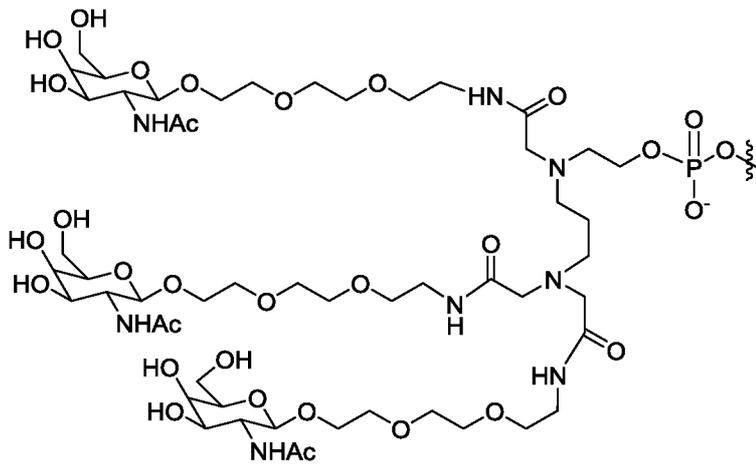
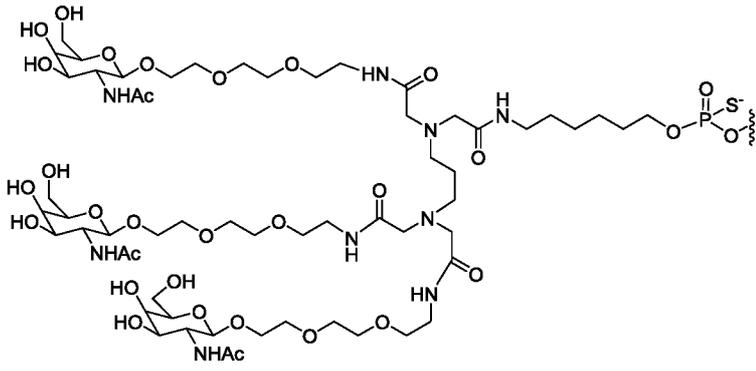
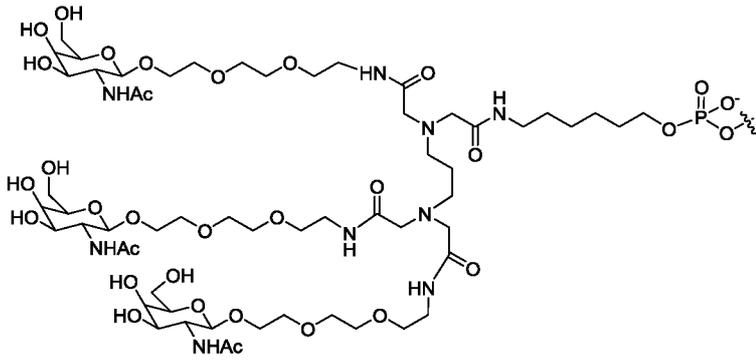
В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы имеют следующие структуры:

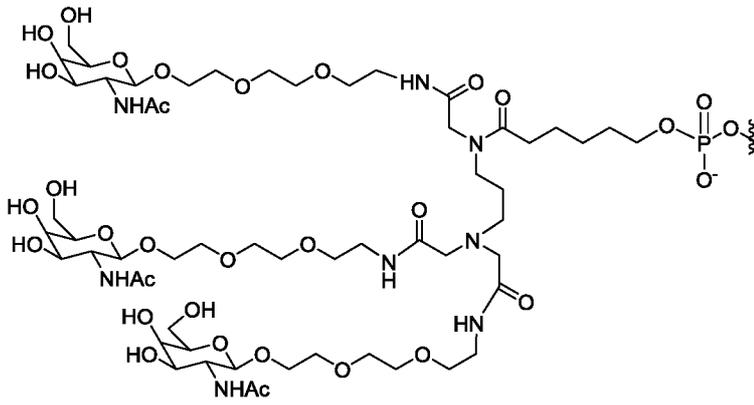


GLO-1,

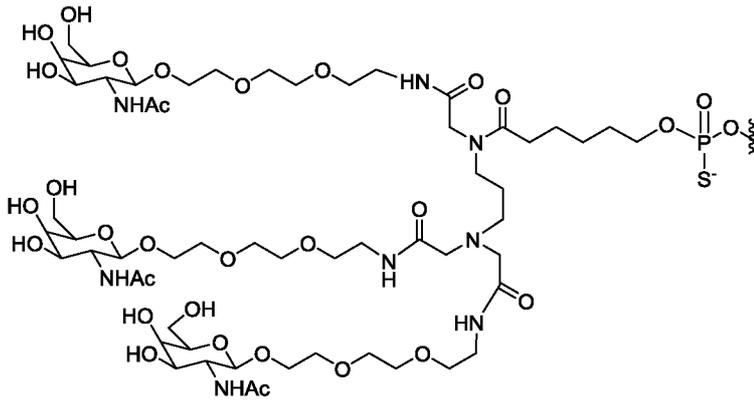


GLS-1,

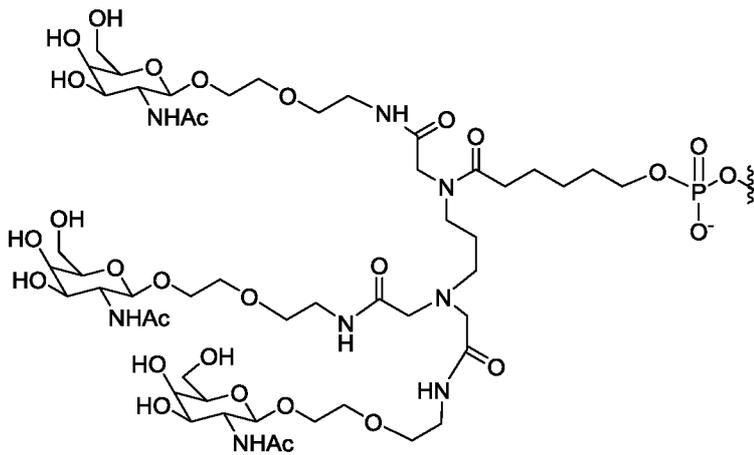




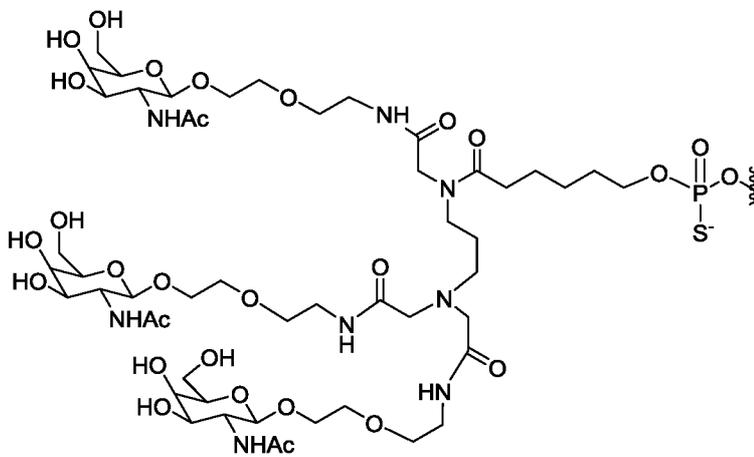
GLO-4,



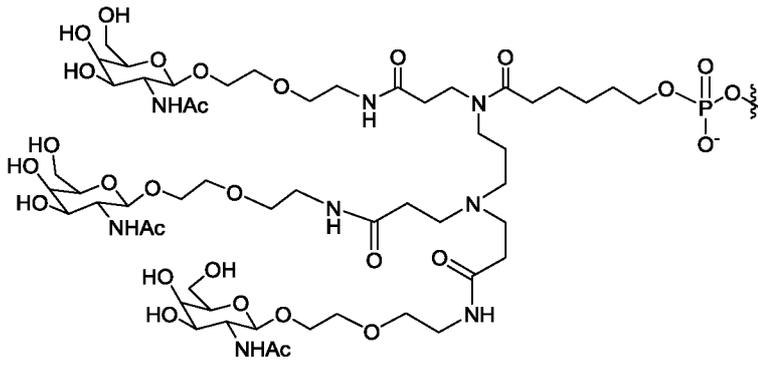
GLS-4,



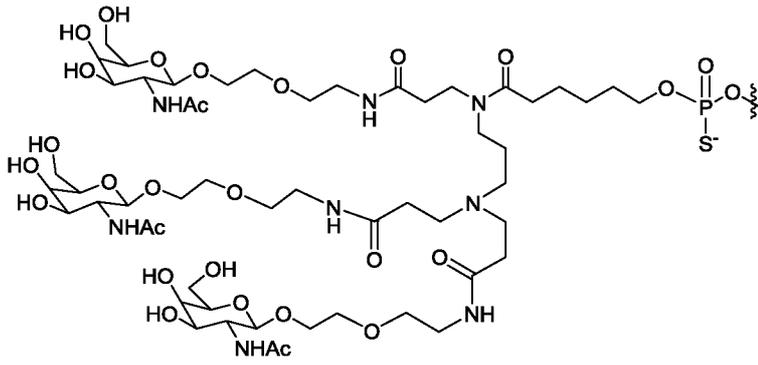
GLO-5,



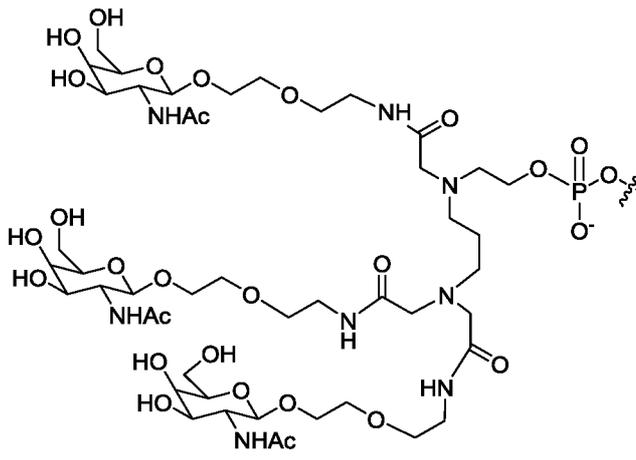
GLS-5,



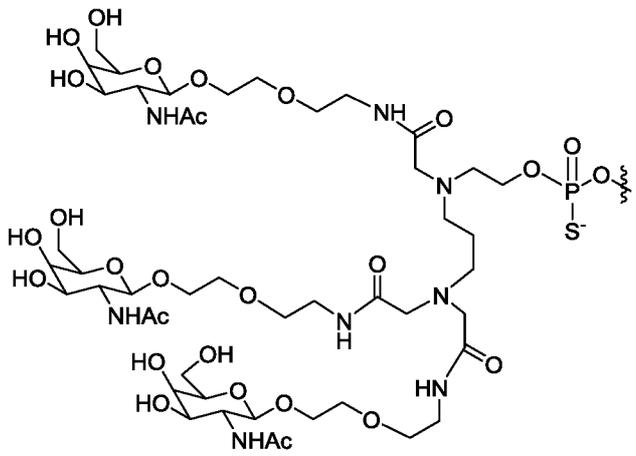
GLO-6,



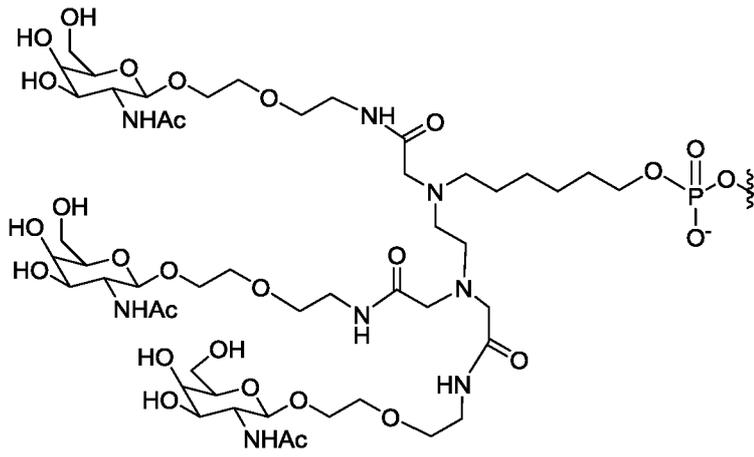
GLS-6,



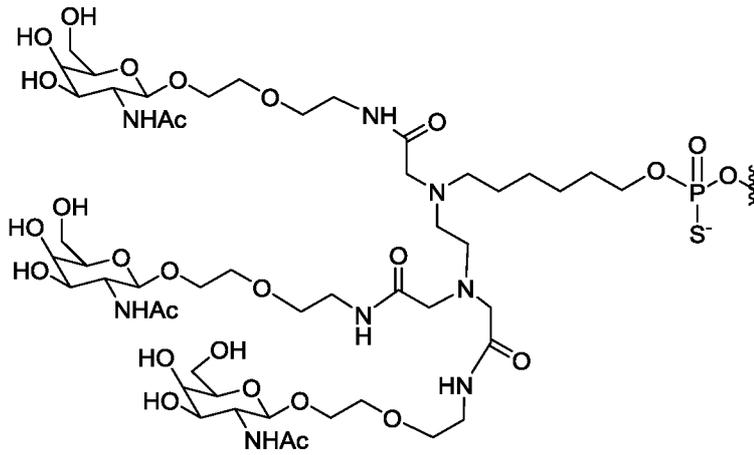
GLO-7,



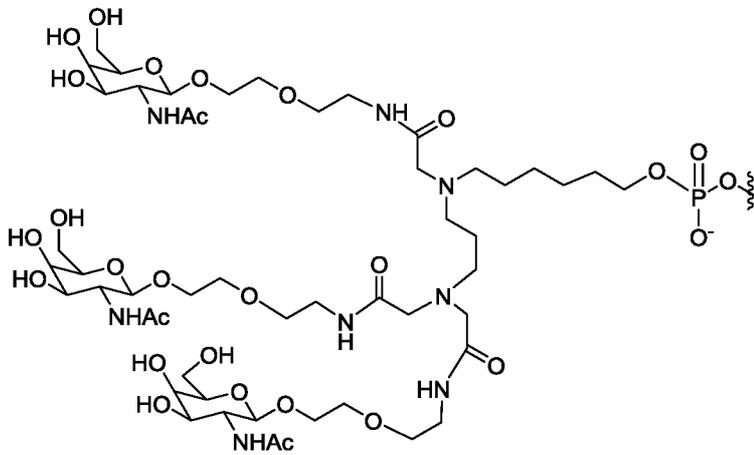
GLS-7,



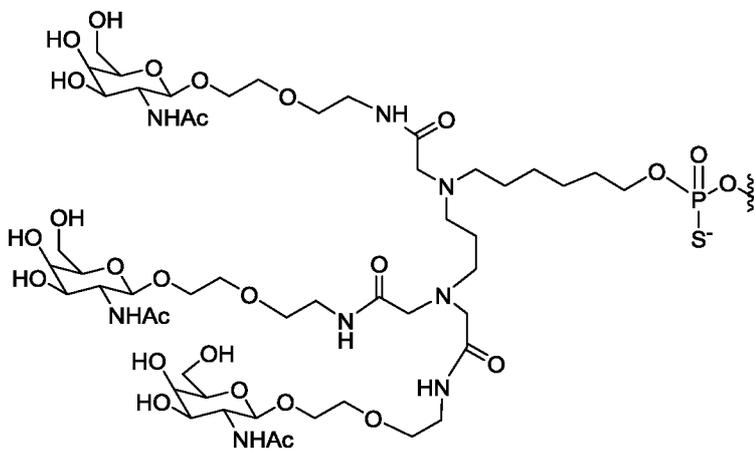
GLO-8,



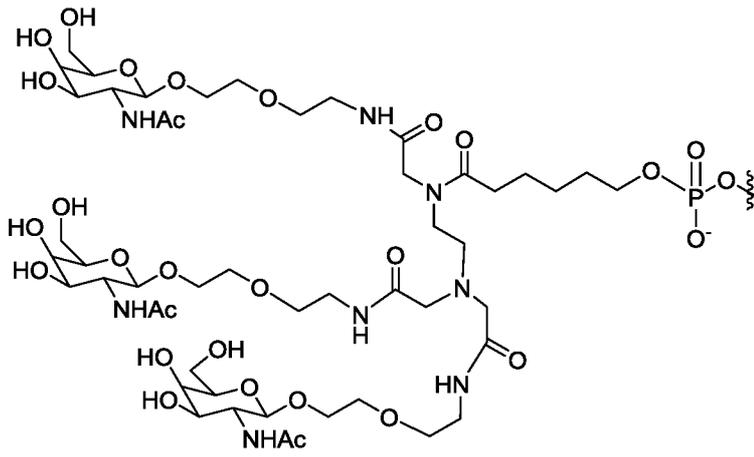
GLS-8,



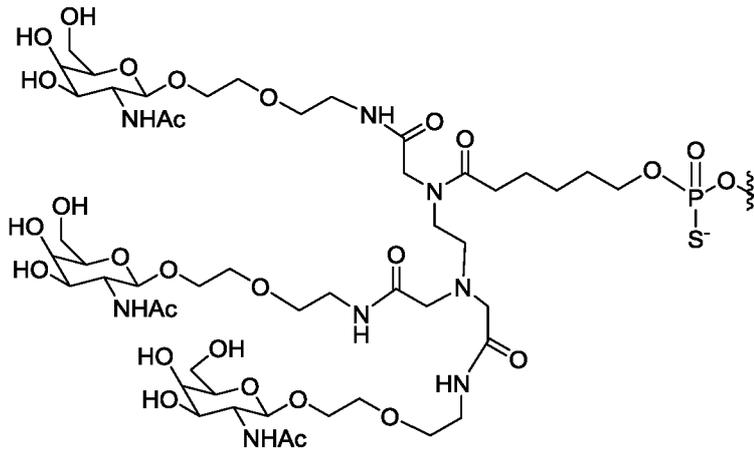
GLO-9,



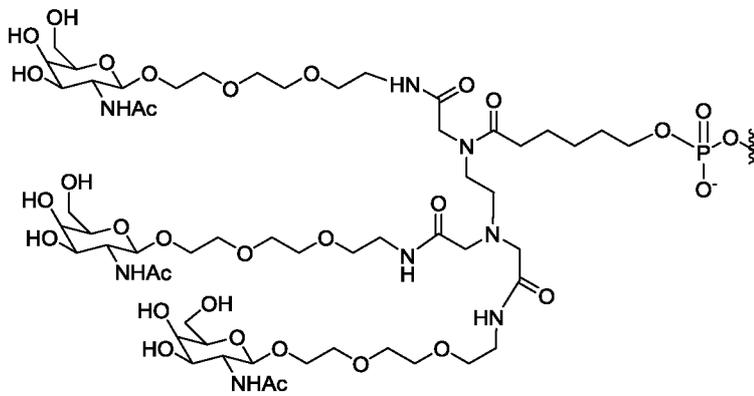
GLS-9,



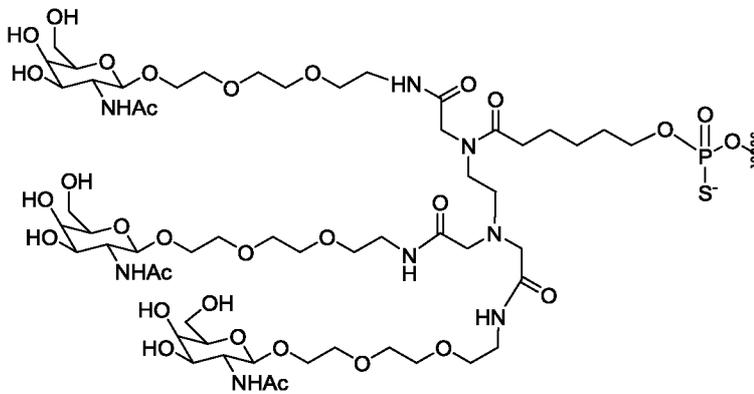
GLO-10,



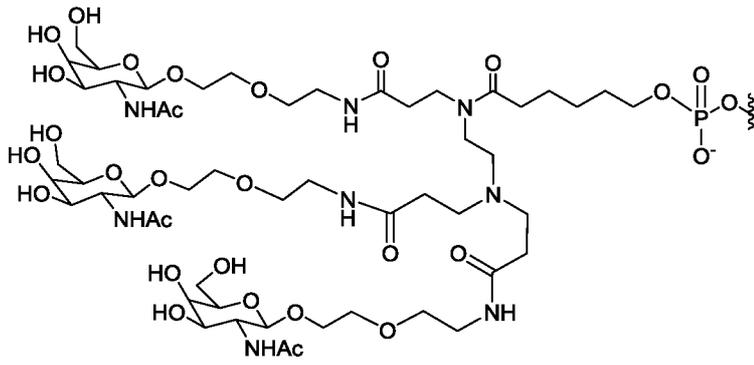
GLS-10,



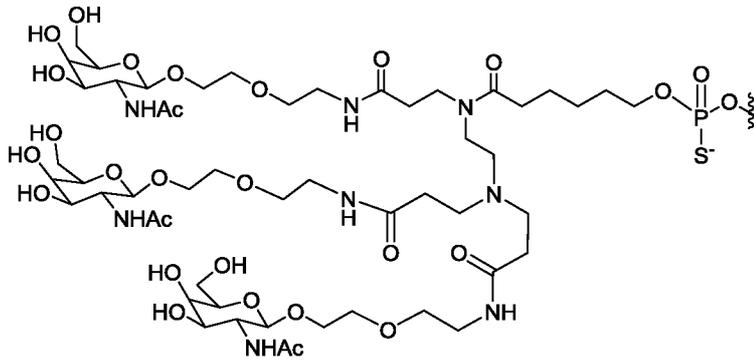
GLO-11,



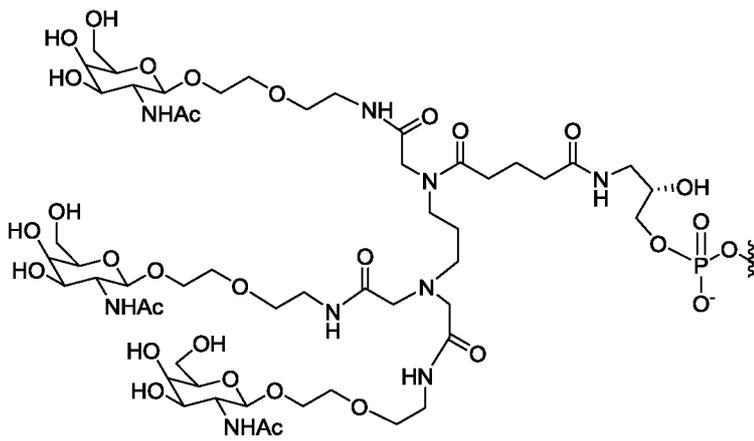
GLS-11,



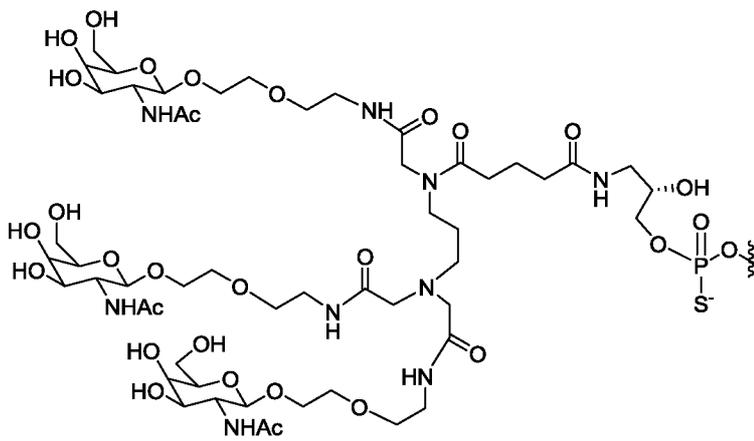
GLO-12,



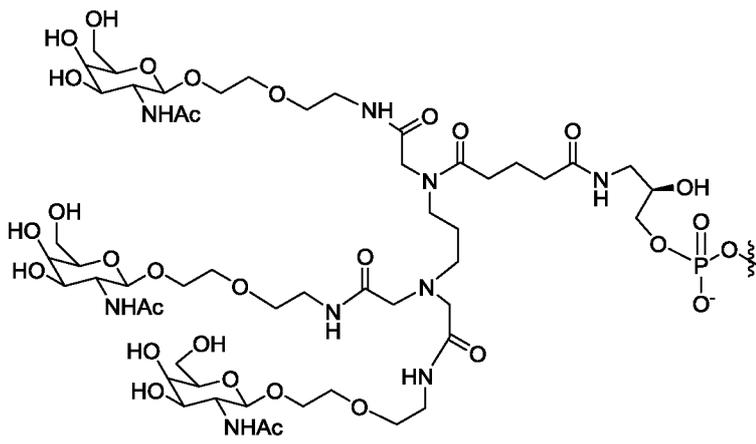
GLS-12,



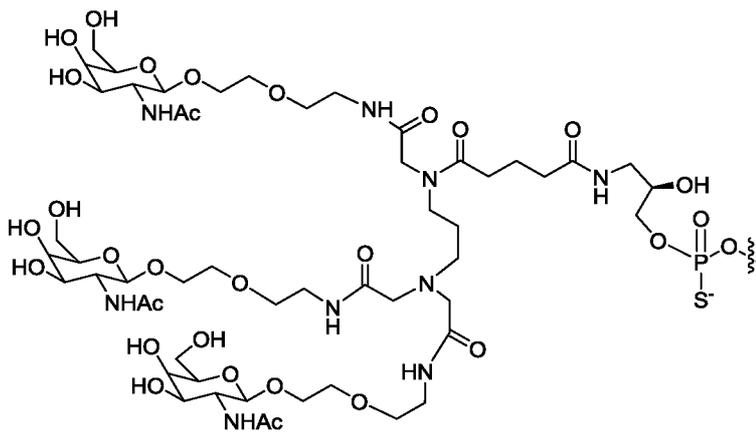
GLO-13,



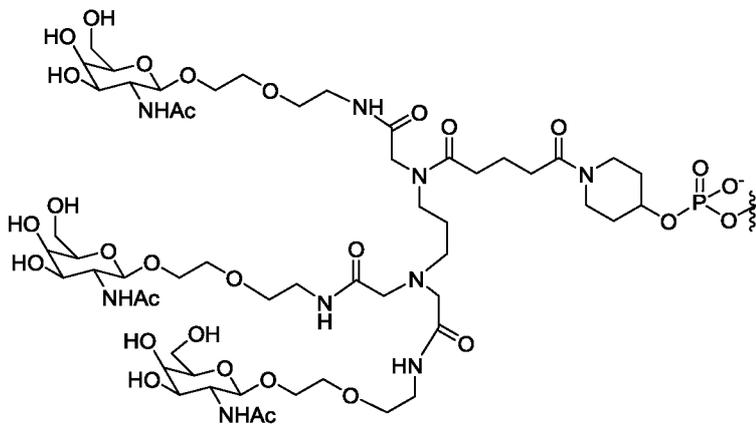
GLS-13,



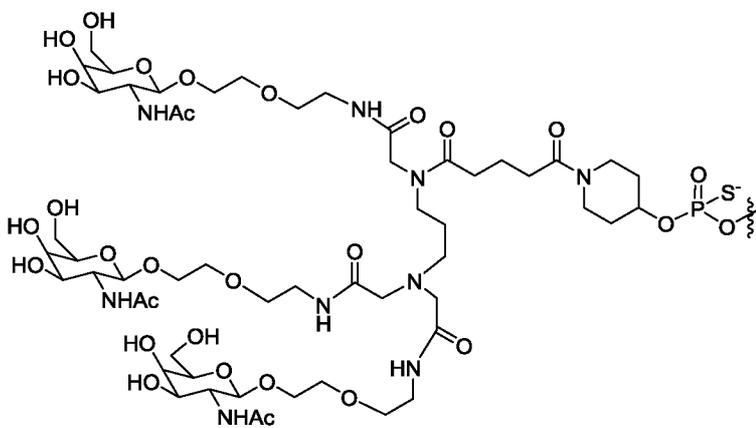
GLO-14,



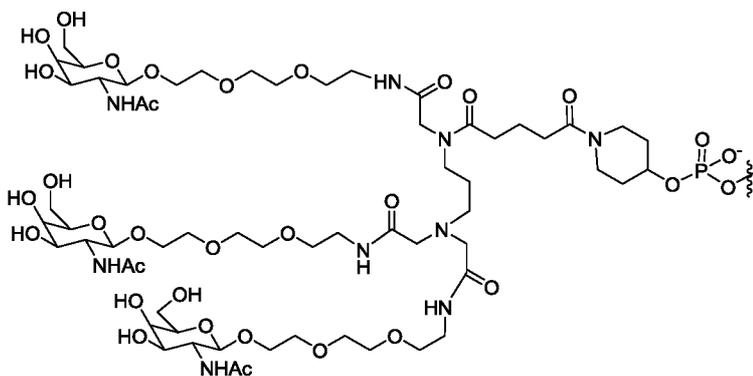
GLS-14,



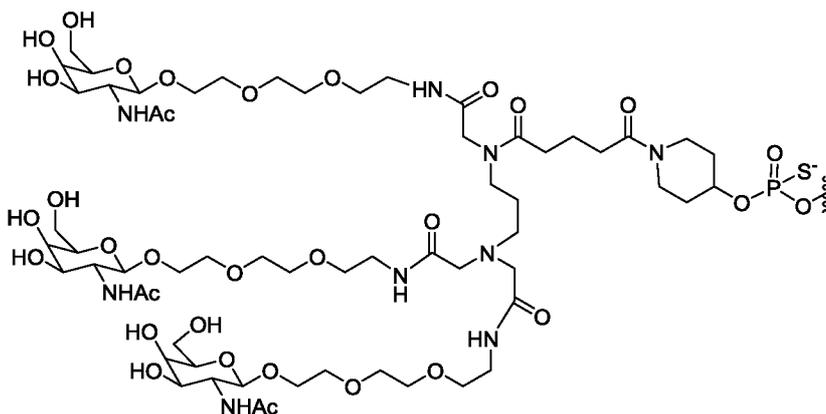
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16 или



GLS-16.

В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит нацеливающую группу, конъюгированную с 5'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит нацеливающую группу, конъюгированную с 3'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит один обратный остаток без основания на 3'-конце. В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит один или два обратных остатка без основания на 3'-конце и/или 5'-конце. В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит один или два остатка изоманнита на 3'-конце и/или 5'-конце. В определенных вариантах осуществления смысловая нить независимо содержит один остаток изоманнита на 3'-конце и 5'-конце соответственно. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь независимо содержит один остаток изоманнита на 3'-конце и 5'-конце соответственно и дополнительно содержит конъюгированную с 5'-концом нацеливающую группу, предпочтительно GLS-15, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA имеет два тупых конца. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий участок, содержащий по меньшей мере 1 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий участок, содержащий по меньшей мере 2 нуклеотида.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии LPA (Apo (a)) содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и нуклеотидные положения 2-18 в антисмысловой нити содержат область, комплементарную РНК-транскрипту LPA,

антисмысловая нить полностью или частично комплементарна смысловой нити, и средство необязательно содержит нацеливающий лиганд, где длина каждой нити составляет 14-30 нуклеотидов, где последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I):



где каждый N'_F представляет собой 2'-фтормодифицированный нуклеотид, каждый из N'_{N1} , N'_{N2} , N'_{N3} и N'_{N4} независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, каждый N'_L независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, но не 2'-фтормодифицированный нуклеотид, n' представляет собой целое число от 0 до 7, и m' представляет собой целое число от 0 до 3. В некоторых вариантах осуществления каждый N'_{N3} представляет собой 2'-фтормодифицированный нуклеотид, N'_{N1} , N'_{N2} и N'_{N4} независимо представляют собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, но не представляют собой 2'-фтормодифицированные нуклеотиды, и m равняется 1. В некоторых вариантах осуществления каждый N'_{N4} представляет собой 2'-фтормодифицированный нуклеотид, N'_{N1} , N'_{N2} и N'_{N3} независимо представляют собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, но не представляют собой 2'-фтормодифицированные нуклеотиды, и m равняется 1. В некоторых вариантах осуществления n' равняется 3, и m' равняется 1, или n' равняется 0, и m' равняется 0, или n' равняется 3, и m' равняется 3. В определенных вариантах осуществления в формуле (I) содержится только три 2'-фтормодифицированных нуклеотида.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к олигомеру незамкнутой нуклеиновой кислоты (UNA) для терапевтического применения. Незамкнутая нуклеиновая кислота (UNA) представляет собой ациклический аналог РНК, в котором разорвана связь между атомами C2' и C3' рибозного кольца. Было продемонстрировано, что включение UNA хорошо переносится в отношении активности сайленсинга гена siRNA и в некоторых случаях даже усиливает активность сайленсинга гена siRNA (Meghan A. et al. "Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals". *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5680-5689).

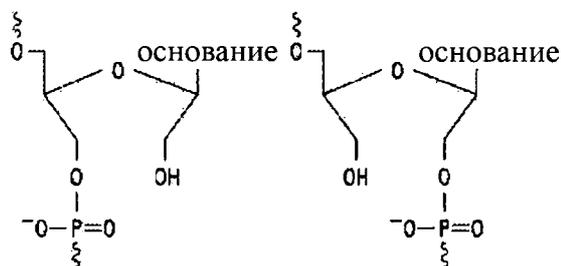
UNA является термолabileй модификацией, и замена рибонуклеотидов на UNA снижает силу спаривания оснований и стабильность дуплекса. Стратегическое размещение UNA в затравочной области антисмысловой нити siRNA снижает нецелевую активность в механизме сайленсинга генов, опосредованного микроРНК (miRNA). Молекулы miRNA идентифицируют целевые гены в первую очередь путем спаривания оснований между антисмысловой затравочной областью (положения 2-8, начиная с 5'-конца) и целевой mRNA для супрессии гена. Каждая miRNA потенциально регулирует большое количество генов. Антисмысловые нити siRNA, загруженные комплексами сайленсинга, индуцируемого с помощью РНК (RISC), также потенциально способны регулировать большое количество непредусмотренных генов посредством miRNA-

опосредованных механизмов. Таким образом, включение термолабильных нуклеотидов, таких как UNA, в затравочную область siRNA может снизить нецелевую активность (Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 15;4(9):e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23. PMID: 26372022; PMCID: PMC4877448.). В частности, такие РНК-олигонуклеотиды или комплексы РНК-олигонуклеотидов содержат по меньшей мере один нуклеотидный мономер UNA в затравочной области (Narendra Vaish et al. "Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analog". *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 5 1823-1832).

Согласно настоящему техническому решению потенциальные преимущества включения UNA в РНК-олигонуклеотиды или комплексы РНК-олигонуклеотидов включают без ограничения следующее:

1. Снижалась нецелевая активность. Добавление UNA в затравочную область siRNA снижает силу спаривания оснований в затравочной области, тем самым снижая потенциальную нецелевую активность, вызванную механизмом с участием микро-РНК.
2. UNA хорошо переносилась с точки зрения активности siRNA. В некоторых случаях UNA может привести к усилению активности.

Иллюстративные мономеры UNA, которые могут быть использованы в настоящем техническом решении, включают без ограничения следующие:



Согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрена композиция, содержащая любой вариант осуществления описанного выше средства на основе dsRNA по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит одно или несколько дополнительных терапевтических средств, таких как ингибитор HMG-Co-A-редуктазы (статины), эзетимиб, ингибитор PCSK-9, ингибитор СТЕР, средство терапии, нацеливающееся на ANGPTL3, средство терапии, нацеливающееся на AGT, средство терапии, нацеливающееся на APOC3, и ниацин или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления композиция упакована в набор, контейнер, упаковку, дозатор, предварительно заполненный шприц или флакон. В некоторых вариантах осуществления композиции составлены для подкожного введения или составлены для внутривенного (IV) введения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрена клетка, которая содержит любой вариант осуществления описанного выше средства на основе dsRNA по

настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего и необязательно клетку человека.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ подавления экспрессии гена LPA в клетке, при этом способ включает: (i) получение клетки, содержащей любой вариант осуществления эффективного количества описанного выше средства на основе dsRNA или описанной выше композиции по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает: (ii) поддержание полученной клетки в течение периода времени, достаточного для достижения разрушения mRNA-транскрипта гена LPA, за счет чего подавляется экспрессия гена LPA в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта, и средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта, и средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV-введения. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает оценивание подавляющего эффекта в отношении гена LPA после введения средства на основе dsRNA субъекту, где способы оценки включают (i) определение одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта и (ii) сравнение идентифицированных физиологических характеристик с исходными физиологическими характеристиками связанного с LPA заболевания или состояния до лечения и/или контроля физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния, где результаты сравнения указывают на наличие или отсутствие подавления экспрессии гена LPA у субъекта. В некоторых вариантах осуществления идентифицированной физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови. Снижение уровня LPA в крови указывает на снижение экспрессии гена LPA у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ подавления экспрессии гена LPA у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества вариантов осуществления описанного выше средства на основе dsRNA или вариантов осуществления описанной выше композиции. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV-введения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает оценивание подавляющего эффекта в отношении гена LPA после введения средства на основе dsRNA, где способы оценки включают (i) определение одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта и (ii) сравнение идентифицированных физиологических характеристик с исходными физиологическими характеристиками связанного с LPA заболевания или состояния до лечения и/или контроля физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния, где результаты сравнения указывают на наличие или отсутствие подавления экспрессии гена LPA у субъекта. В некоторых вариантах осуществления идентифицированной физиологической характеристикой является уровень

Lp(a) в крови. Снижение уровня LPA в крови указывает на снижение экспрессии гена LPA у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ лечения ассоциированного с белком LPA заболевания или состояния, включающий введение субъекту эффективного количества любого варианта осуществления вышеупомянутого средства на основе dsRNA по настоящему изобретению или любого варианта осуществления вышеупомянутой композиции по настоящему изобретению для подавления экспрессии гена LPA. В определенных вариантах осуществления связанное с LPA нарушение представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, где сердечно-сосудистое заболевание включает болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперapoлипопротеинбеталипопротеинемию, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает назначение субъекту дополнительной терапевтической схемы. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапевтическая схема предусматривает лечение связанных с LPA заболеваний или состояний. В некоторых вариантах осуществления дополнительные терапевтические схемы предусматривают введение субъекту одного или нескольких антисмысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению, введение субъекту терапевтического средства, отличного от средства на основе dsRNA LPA, и осуществление поведенческих модификаций у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство, отличное от средства на основе dsRNA LPA, представляет собой одно из дополнительных терапевтических средств, таких как ингибитор HMG-Co-A-редуктазы (статины), эзетимиб, ингибитор PCSK-9, ингибитор СТЕР, средство терапии, нацеливающееся на ANGPTL3, средство терапии, нацеливающееся на APOC3, и ниацин или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту путем IV-введения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение эффективности введенного субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA). В некоторых вариантах осуществления способы определения эффективности лечения у субъекта включают: (i) определение одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта, (ii) сравнение определенного физиологического

профиля с исходными физиологическими характеристиками связанного с LPA заболевания или состояния до лечения, где результаты сравнения указывают на одно или несколько из наличия, отсутствия и уровней эффективности средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), введенного субъекту. В некоторых вариантах осуществления идентифицированной физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови. Снижение уровня LPA в крови указывает на эффективность введения субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ снижения уровня белка LPA у субъекта по сравнению с исходным уровнем белка LPA у субъекта до лечения, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества любого варианта осуществления вышеупомянутого средства на основе dsRNA по настоящему изобретению или любого варианта осуществления вышеупомянутой композиции по настоящему изобретению для снижения уровня экспрессии гена LPA. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или вводят субъекту IV-путем.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ изменения физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта по сравнению с исходными физиологическими характеристиками связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта до лечения, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества любого варианта осуществления вышеупомянутого средства на основе dsRNA по настоящему изобретению или любого варианта осуществления вышеупомянутой композиции по настоящему изобретению для изменения физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или вводят субъекту IV-путем. В определенных вариантах осуществления физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови.

Описание последовательностей

Дуплексы AV00122-AD00484-1, AD00474-2, AV01867-AV01968 показаны в таблице 1, и также показаны их последовательности смысловой нити.

Дуплексы AV00122-AD00484-1, AD00474-2, AV01867-AV01968 показаны в таблице 1, и также показаны их последовательности антисмысловой нити.

В последовательности, показанной в таблице 2, химические модификации обозначены следующим образом: заглавные буквы - 2'-фтор; строчные буквы - 2'-ОМе; фосфоротиоат - *.

В последовательностях, показанных в таблице 3, молекула для доставки, применяемая в исследовании *in vivo*, обозначена как "GLO-0" на 3'-конце каждой смысловой нити. Молекула для доставки, применяемая в исследовании *in vivo*, обозначена как "GLS-5" или "GLS-15" на 5'-конце каждой смысловой нити, а химические модификации обозначены следующим образом: заглавные буквы - 2'-фтор; строчные

буквы - 2'-ОМе; фосфоротиоат - *, и незамкнутая нуклеиновая кислота - UNA.

Ниже представлена последовательность mRNA Lp(a) человека (SEQ ID NO: 1):
NM_005577.4, липопротеин(a) (LPA) *Homo sapiens*, mRNA

ГТААГТСААСААТГТСТТГГГАТТГГГАСАСАСТТТСТГГГСАСТГСТГГСС
АГТСССААААТГГААСАТААГГААГТГГТТСТТСТАСТТСТТТТТТТТСТГАААТСА
ГСАГСАССТГАГСАААГССАТГТГГТССАГГАТТГСТАССАТГГТГАТГГАСАГАГ
ТТАТСГАГГСАСТАСТСАСАСТГТСАСАГГААГГАССТГССААГСТТГГТСАТС
ТАТГАСАСАСАТСААСАТААТАГГАССАСАГААААСТАСССАААТГСТГГСТТГА
ТСАТГААСТАСТГСАГГААТССАГАТГСТГТГГСАСТССТТАТТГТТАТАСГАГГГ
АТСССГГТГТСАГГТГГГАГТАСТГСААССТГАСГСААТГСТСАСАСГСАГААГГГ
АСТГСССГТСГСГССТССГАСТГТТАССССГГТТССААГССТАГАГГСТССТТССГА
СААГСАССГАСТГАСГАААГГССТГГГГТГСАГГАГТГСТАССАТГГТААТГГАСА
ГАГТТАТСГАГГСАСАТАСТСАСАСТГТСАСАГГААГААССТГССААГСТТГГТ
САТСТАТГАСАСАСАСТСГСАТАГТСГГАССССАГААТАСТАСССАААТГСТГГСТ
ТГАТСАТГААСТАСТГСАГГААТССАГАТГСТГТГГСАСТССТТАТТГТТАТАСГА
ГГГАТСССГГТГТСАГГТГГГАГТАСТГСААССТГАСГСААТГСТСАСАСГСАГАА
ГГГАСТГСССГТСГСГССТССГАСТГТТАССССГГТТССААГССТАГАГГСТССТТСС
ГААСААГСАССГАСТГАСГАААГГССТГГГГТГСАГГАГТГСТАССАТГГТААТГГ
АСАГАГТТАТСГАГГСАСАТАСТСАСАСТГТСАСАГГААГААССТГССААГСТТ
ГГТСАТСТАТГАСАСАСАСТСГСАТАГТСГГАССССАГААТАСТАСССАААТГСТГ
ГСТТГАТСАТГААСТАСТГСАГГААТССАГАТГСТГТГГСАСТССТТАТТГТТАТА
САГГГГАТСССГГТГТСАГГТГГГАГТАСТГСААССТГАСГСААТГСТСАСАСГСА
ГААГГГАСТГСССГТСГСГССТССГАСТГТТАССССГГТТССААГССТАГАГГСТССТ
ТССГААСААГСАССГАСТГАСГАААГГССТГГГГТГСАГГАГТГСТАССАСГГТАА
ТГГАСАГАГТТАТСГАГГСАСАТАСТСАСАСТГТСАСТГГААГААССТГССААГ
СТТГГТСАТСТАТГАСАСАСАСТСГСАТАГТСГГАССССАГААТАСТАСССАААТГ
СТГГСТТГАТСАТГААСТАСТГСАГГААТССАГАТГСТГТГГСАСТССТТАТТГТТ
АТАСГАГГГАТСССГГТГТСАГГТГГГАГТАСТГСААССТГАСГСААТГСТСАСА
СГАГААГГГАСТГСССГТСГСГССТССГАСТГТТАССССГГТТССААГССТАГА
ГГСТССТТССГААСААГСАССГАСТГАСГАААГГССТГГГГТГСАГГАГТГСТАСС
АТГГТААТГГАСАГАГТТАТСГАГГСАСАТАСТСАСАСТГТСАСАГГААГААСС
ТГССААГСТТГГТСАТСТАТГАСАСАСАСТСГСАТАГТСГГАССССАГААТАСТА
ССАААТГСТГГСТТГАТСАТГААСТАСТГСАГГААТССАГАТГСТГТГГСАСТССТ
ТАТТГТТАТАСГАГГГАТСССГГТГТСАГГТГГГАГТАСТГСААССТГАСГСААТГС

TCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGTTCCAAGCCTA
GAGGCTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAAAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGCTA
CCATGGTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACAGGAAGAA
CCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGAATACT
ACCCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGTGGCAGCTC
CTTATTGTTATACGAGGGATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACGCAAT
GCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGTTCCAAGCC
TAGAGGCTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAGAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGC
TACCACGGTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACTGGAAG
AACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGAATA
CTACCCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATCCTGTGGCAGC
CCCTTATTGTTATACGAGGGATCCCAGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACACA
ATGCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCAATATTACCCCGATTCCAAG
CCTAGAGGCTCCTTCTGAACAAGCACCAACTGAGCAAAGGCCTGGGGTGCAGGAGT
GCTACCACGGAAATGGACAGAGTTATCAAGGCACATACTTCATTACTGTCACAGGA
AGAACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGCA
TACTACCCAAATGCTGGCTTGATCAAGAACTACTGCCGAAATCCAGATCCTGTGGCA
GCCCCTTGGTGTTATACAACAGATCCCAGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACA
CGATGCTCAGATGCAGAATGGACTGCCTTCGTCCCTCCGAATGTTATTCTGGCTCCA
AGCCTAGAGGCTTTTTTTGAACAAGCACTGACTGAGGAAACCCCGGGGTACAGGA
CTGCTACTACCATTATGGACAGAGTTACCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACAGG
AAGAACTTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACCAGCATAGTCGGACCCCAG
AAAATACCCAAATGCTGGCCTGACCAGGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGAG
ATTCGCCCTTGGTGTTACACCATGGATCCCAGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTG
ACACAATGCCTGGTGACAGAATCAAGTGTCCTTGCAACTCTCACGGTGGTCCCAGAT
CCAAGCACAGAGGCTTCTTCTGAAGAAGCACCAACGGAGCAAAGCCCCGGGGTCCA
GGATTGCTACCATGGTGATGGACAGAGTTATCGAGGCTCATTCTCTACCACTGTCAC
AGGAAGGACATGTCAGTCTTGGTCCTCTATGACACCACACTGGCATCAGAGGACAA
CAGAATATTATCCAAATGGTGGCCTGACCAGGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCT
GAGATTAGTCCTTGGTGTTATACCATGGATCCCAATGTCAGATGGGAGTACTGCAAC
CTGACACAATGTCCAGTGACAGAATCAAGTGTCCTTGCGACGTCCACGGCTGTTTCT
GAACAAGCACCAACGGAGCAAAGCCCCACAGTCCAGGACTGCTACCATGGTGATGG
ACAGAGTTATCGAGGCTCATTCTCCACCACTGTTACAGGAAGGACATGTCAGTCTTG
GTCCTCTATGACACCACACTGGCATCAGAGAACCACAGAATACTACCCAAATGGTG
GCCTGACCAGGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGAGATTGCGCCTTGGTGTTATA
CCATGGATCCCAGTGTCAGATGGGAGTACTGCAACCTGACGCAATGTCCAGTGATG
GAATCAACTCTCCTCACAACCTCCACGGTGGTCCCAGTTCCAAGCACAGAGCTTCT
TCTGAAGAAGCACCAACTGAAAACAGCACTGGGGTCCAGGACTGCTACCGAGGTGA
TGACAGAGTTATCGAGGCACACTCTCCACCACTATCACAGGAAGAACATGTCAGT
CTTGGTCGTCTATGACACCACATTGGCATCGGAGGATCCCATTATACTATCCAAATG

CTGGCCTGACCAGGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGAGATTCGCCCTTGGTGT
 ACACCATGGATCCCAGTGTGAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACACGATGTCCAGTG
 ACAGAATCGAGTGTCTCACAACCTCCACAGTGGCCCCGGTTCCAAGCACAGAGGC
 TCCTTCTGAACAAGCACCACTGAGAAAAGCCCTGTGGTCCAGGATTGCTACCATGG
 TGATGGACGGAGTTATCGAGGCATATCCTCCACCACTGTCACAGGAAGGACCTGTC
 AATCTTGGTCATCTATGATAACCACACTGGCATCAGAGGACCCCAGAAAACCTACCCA
 AATGCTGGCCTGACCGAGAACTACTGCAGGAATCCAGATTCTGGGAAACAACCTGT
 GTGTTACACAACCGATCCGTGTGTGAGGTGGGAGTACTGCAATCTGACACAATGCTC
 AGAAACAGAATCAGGTGTCCTAGAGACTCCCCTGTTGTTCCAGTTCCAAGCATGGA
 GGCTCATTCTGAAGCAGCACCAACTGAGCAAACCCCTGTGGTCCGGCAGTGCTACC
 ATGGTAATGGCCAGAGTTATCGAGGCACATTCTCCACCACTGTCACAGGAAGGACA
 TGTCAATCTTGGTCATCCATGACACCACACCGGCATCAGAGGACCCCAGAAAACCTA
 CCCAAATGATGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCCGATACAGGCC
 CTTGGTGTTTTACCATGGACCCCAGCATCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACGCGAT
 GCTCAGACACAGAAGGGACTGTGGTTCGCTCCTCCGACTGTCATCCAGGTTCCAAGCC
 TAGGGCCTCCTTCTGAACAAGACTGTATGTTTGGGAATGGGAAAGGATACCGGGGC
 AAGAAGGCAACCACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGAATGGGCTGCCCAGGAGCC
 CCATAGACACAGCACGTTTATTCCAGGGACAAATAAATGGGCAGGTCTGGAAAAAA
 ATTACTGCCGTAACCCTGATGGTGACATCAATGGTCCCTGGTGCTACACAATGAATC
 CAAGAAAACCTTTTTGACTACTGTGATATCCCTCTCTGTGCATCCTCTTCATTTGATTG
 TGGGAAGCCTCAAGTGGAGCCGAAGAAATGTCCTGGAAGCATTGTAGGGGGGTGTG
 TGGCCACCCACATTCCTGGCCCTGGCAAGTCAGTCTCAGAACAAGGTTTGGAAAGC
 ACTTCTGTGGAGGCACCTTAATATCCCCAGAGTGGGTGCTGACTGCTGCTCACTGCT
 TGAAGAAGTCCTCAAGGCCTTCATCCTACAAGGTCATCCTGGGTGCACACCAAGAA
 GTGAACCTCGAATCTCATGTTGAGGAAATAGAAGTGTCTAGGCTGTTCTTGGAGCCC
 ACACAAGCAGATATTGCCTTGCTAAAGCTAAGCAGGCCTGCCGTCATCACTGACAA
 AGTAATGCCAGCTTGTCTGCCATCCCCAGACTACATGGTCACCGCCAGGACTGAATG
 TTACATCACTGGCTGGGGAGAAACCCAAGGTACCTTTGGGACTGGCCTTCTCAAGGA
 AGCCCAGCTCCTTGTATTGAGAATGAAGTGTGCAATCACTATAAGTATATTTGTGC
 TGAGCATTTGGCCAGAGGCACTGACAGTTGCCAGGGTGACAGTGGAGGGCCTCTGG
 TTTGCTTCGAGAAGGACAAATACATTTTACAAGGAGTCACTTCTTGGGGTCTTGGCT
 GTGCACGCCCCAATAAGCCTGGTGTCTATGCTCGTGTTC AAGGTTTGTACTTGGAT
 TGAGGGAATGATGAGAAATAATTAATTGGACGGGAGACAGAGTGAAGCATCAACCT
 ACTTAGAAGCTGAAACGTGGGTAAGGATTTAGCATGCTGGAAATAATAGACAGCAA
 TCAAACGAAGACACTGTTCCCAGCTACCAGCTATGCCAAACCTTGGCATTTTTGGTA
 TTTTGTGTATAAGCTTTTAAGGTCTGACTGACAAATTCTGTATTAAGGTGTCATAGC
 TATGACATTTGTTAAAAATAAACTCTGCACTTATTTT GATTGAA

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана схематическая диаграмма уровней белка LPA в сыворотке крови обезьян.

На фиг. 2 представлена схематическая диаграмма уровней белка LPA AD00480-8 в сыворотке крови обезьян в дозе 2 мг/кг.

Подробное описание вариантов осуществления

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают средства для RNAi, способные подавлять экспрессию гена LPA (Apo(a)), такие как без ограничения двухнитевые (ds) средства для RNAi. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно включают композиции, содержащие средства для RNAi LPA, и способы применения этих композиций. Средства для RNAi LPA, раскрытые в данном документе, могут быть присоединены к соединению для доставки с целью доставки в клетки, в том числе доставки в гепатоциты. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере одно средство на основе dsRNA и соединение для доставки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение для доставки представляет собой GalNAc-содержащее соединение для доставки. Средство для RNAi LPA, доставляемое в клетки, способно подавлять экспрессию гена LPA, тем самым уменьшая количество белкового продукта гена, представляющего собой LPA. Средство для dsRNAi по настоящему изобретению может быть использовано для лечения связанных с LPA заболеваний и состояний. Такие средства для dsRNAi включают, например, дуплексы AV00122-AD00484-1, AD00474-2, AV01867-AV01968, показанные в таблице 1. В других вариантах осуществления такие средства для dsRNAi предусматривают дуплексные варианты, такие как варианты дуплексов AV00122-AD00484-1, AD00474-2 и AV01867-AV01968.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения снижение экспрессии LPA в клетках или у субъектов обеспечивает лечение заболеваний или состояний, ассоциированных с экспрессией LPA в клетках или у субъектов соответственно. Неограничивающими примерами заболевания и состояния, которые можно лечить путем снижения экспрессии LPA, являются сердечно-сосудистые заболевания, включая болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперapoлипопротеинбеталипопротеинемию, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц.

Ниже описано, как получать и применять композиции, содержащие одонитевые (ssRNA) и двухнитевые (dsRNA) средства, воздействующие на LPA, для подавления экспрессии гена LPA, а также композиции и способы для лечения заболеваний и

состояний, вызываемых или регулируемых экспрессией гена LPA. Термин "RNAi" также известен из уровня техники и может называться "siRNA".

Используемый в данном документе термин "RNAi" относится к средствам, которые содержат РНК и опосредуют целенаправленное расщепление РНК-транскриптов посредством пути с участием комплекса сайленсинга, индуцируемого с помощью РНК (RISC). Как известно из уровня техники, целевая область RNAi относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы РНК, образующейся во время транскрипции гена, которая включает матричную РНК (mRNA), которая является процессированным продуктом первичного РНК-продукта транскрипции. Целевая часть данной последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной для того, чтобы ее можно было применять в качестве субстрата для RNAi-направляемого расщепления в этой части или рядом с ней. Длина целевой последовательности может составлять 8-30 нуклеотидов (включительно), 10-30 нуклеотидов (включительно), 12-25 нуклеотидов (включительно), 15-23 нуклеотида (включительно), 16-23 нуклеотида (включительно) или 18-23 нуклеотида (включительно), и она содержит все более короткие отрезки в пределах каждого предписанного диапазона. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения длина целевой последовательности составляет 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от 9 до 26 нуклеотидов (включительно), включая все поддиапазоны и целые числа между ними. Например, хотя это и не является ограничительным, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения длина целевой последовательности составляет 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, при этом она полностью или в по меньшей мере значительной степени комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена LPA. Некоторые аспекты настоящего изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько средств на основе dsRNA LPA и фармацевтически приемлемые носители. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство для RNAi LPA, как описано в данном документе, подавляет экспрессию белка LPA.

Используемый в данном документе термин "средство на основе dsRNA" относится к композиции, содержащей РНК или РНК-подобные (например, химически модифицированная РНК) олигонуклеотидные молекулы, способные разрушать целевые mRNA-транскрипты или подавлять трансляцию целевых mRNA-транскриптов. Без желания ограничиваться конкретными теориями, средство на основе dsRNA по настоящему изобретению может функционировать посредством механизма РНК-интерференции (т. е. индуцировать осуществление РНК-интерференции путем взаимодействия с механизмом пути РНК-интерференции в клетках млекопитающих (комплексом сайленсинга, индуцируемого с помощью РНК, или RISC)) или любым альтернативным механизмом или путем. Способы достижения сайленсинга генов в клетках растений, беспозвоночных и позвоночных хорошо известны из уровня техники

(см., например, Sharp et al., *Genes Dev.* 2001, 15:485; Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363; Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309; и Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188)), соответствующие раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способы сайленсинга генов, известные из уровня техники, могут быть использованы в сочетании с представленными в данном документе раскрытиями для достижения подавления экспрессии LPA.

Средство на основе dsRNA, раскрытое в данном документе, состоит из смысловой нити и антисмысловой нити и включает без ограничения короткую интерферирующую РНК (siRNA), средство для RNAi, микроРНК (miRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA) и субстрат Dicer. Антисмысловая нить средства на основе dsRNA, описанного в данном документе, по меньшей мере частично комплементарна целевой mRNA, и в данной области техники понятно, что для подавления экспрессии целевого гена могут быть использованы дуплексные dsRNA-структуры различной длины. Например, известно, что dsRNA с дуплексными структурами из 19, 20, 21, 22 и 23 пар оснований эффективно индуцируют РНК-интерференцию (Elbashir et al., *EMBO* 2001, 20: 6877-6888). Из уровня техники также известно, что эффективно индуцировать РНК-интерференцию также способны более короткие или более длинные дуплексные РНК-структуры. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения dsRNA LPA может содержать по меньшей мере одну нить длиной по меньшей мере 21 нуклеотид, или длина дуплекса может составлять минус 1, 2, 3 нуклеотида или меньше от длины любой одной из последовательностей, указанных в таблицах 1-3. Также может быть эффективным уменьшение длины на 4 нуклеотида на одном или обоих концах dsRNA по сравнению с dsRNA, указанными в таблицах 1-3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA может содержать частичные последовательности из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из одной или нескольких последовательностей из таблиц 1-3, и их способность подавлять экспрессию гена LPA отличается на не более чем 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% от уровня подавления, достигаемого при применении dsRNA, содержащей полную последовательность (в данном документе также называемую "исходными" последовательностями).

Определенные варианты осуществления композиций и способов по настоящему изобретению включают одонитевую РНК в композициях и/или введение одонитевой РНК субъекту. Например, антисмысловые нити, указанные в любой из таблиц 1-3, могут быть использованы в качестве композиции или в составе композиции, которая при введении субъекту снижает экспрессию полипептида LPA и/или гена LPA у субъекта. В таблицах 1-3 показаны последовательности оснований удлинения коровой части антисмысловой нити и смысловой нити некоторых средств на основе dsRNA LPA. Одонитевые антисмысловые молекулы, которые могут быть включены в определенные композиции по настоящему изобретению и/или введены в определенных способах по настоящему изобретению, называются в данном документе "средством на основе

однонитевой антисмысловой последовательности" или "средством на основе антисмыслового полинуклеотида". Однонитевые смысловые молекулы, которые могут быть включены в определенные композиции и/или введены в определенных способах по настоящему изобретению, называются в данном документе "средством на основе однонитевой смысловой последовательности" или "средством на основе смыслового полинуклеотида". Термин "последовательность оснований" используется в данном документе для обозначения полинуклеотидных последовательностей без химических модификаций или соединений для доставки. Например, смысловая нить, показанная в таблице 1, соответствует соответствующей последовательности оснований в таблице 3, но соответствующие химические модификации и соединения для доставки показаны в соответствующих последовательностях в таблице 3. Последовательностям, раскрытым в данном документе, могут быть присвоены идентификаторы. Например, однонитевая смысловая последовательность может быть указана как "SS№ смысловой нити", однонитевая антисмысловая последовательность может быть указана как "AS№ антисмысловой нити", а дуплекс, содержащий смысловую нить и антисмысловую нить, может быть указан как "AD№ дуплекса".

Таблица 1 включает как смысловую, так и антисмысловую нити, и идентификационные номера для дуплекса, образованного смысловой и антисмысловой нитями, приведены в одной строке таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антисмысловая последовательность содержит либо нуклеиновое основание ц, либо нуклеиновое основание а в своем положении 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антисмысловая последовательность содержит нуклеиновое основание ц в положении 1 антисмысловой последовательности. Используемый в данном документе термин "соответствующее положение" в некотором смысле относится к положению в каждой цепи, которое "спаривается" с другой цепью, когда две цепи образуют дуплекс. Например, в смысловой нити из 21 нуклеинового основания и антисмысловой нити из 21 нуклеинового основания положение 1 смысловой нити находится в "соответствующем положении" с нуклеиновым основанием в положении 21 антисмысловой нити. В другом неограничивающем примере для смысловой нити из 23 нуклеиновых оснований и антисмысловой нити из 23 нуклеиновых оснований нуклеиновое основание в положении 2 смысловой нити находится в "соответствующем положении" с нуклеиновым основанием в положении 22 антисмысловой нити. В другом неограничивающем примере в смысловой нити из 18 нуклеиновых оснований и антисмысловой нити из 18 нуклеиновых оснований нуклеиновое основание в положении 1 смысловой нити находится в соответствующем положении с нуклеиновым основанием в положении 18 антисмысловой нити, а нуклеиновое основание в положении 4 в смысловой нити находится в соответствующем положении с нуклеиновым основанием в положении 15 в антисмысловой нити. Специалист поймет, как идентифицировать соответствующие положения между смысловыми и антисмысловыми нитями двойных и спаренных нитей.

В столбце в таблице 1 представлен AV№ дуплекса, AD№ дуплекса, который

содержит как смысловые, так и антисмысловые последовательности в одной и той же строке таблицы. Например, в таблице 1 раскрыт дуплекс, обозначенный как "дуплекс AV00122", который содержит соответствующую последовательность смысловой нити и последовательность антисмысловой нити. Таким образом, в каждой строке в таблице 1 указан дуплекс по настоящему изобретению, и каждый дуплекс содержит смысловую последовательность и антисмысловую последовательность, отображаемые в одной и той же строке, а назначенный идентификатор для каждого дуплекса отображен в последнем столбце строки.

В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению субъекту вводят средство для RNAi, содержащее полинуклеотидную последовательность, показанную в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вводимое субъекту средство для RNAi содержит дуплекс, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей оснований, указанных в таблице 1 и содержащих 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 модификации последовательности. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению также включено присоединение средства для RNAi с полинуклеотидной последовательностью, показанной в таблице 1, к молекуле для доставки, неограничивающим примером которой является GalNAc-содержащее соединение для доставки.

Таблица 1. Последовательности антисмысловой и смысловой нитей средства для RNAi LPA без модификации. Все последовательности показаны в направлениях от 5' к 3'. AV№ или AD№ дуплекса представляет собой номер, присвоенный дуплексу из двух цепей в одной строке таблицы

Номер дуплекса	Последовательность оснований смысловой цепи	Seq ID NO	Последовательность оснований антисмысловой нити	Seq ID NO
AV00122	CUGGUCCAGGAUUGCUACC AA	2	UUGGUAGCAAUCCUGGACC AG	129
AV00123	CUGAUGGACAGAGUUAUCG AA	3	UUCGAUAACUCUGUCCAUC AG	130
AV00124	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	4	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UG	131
AV00125	GCCUGCCAAGCUUGGUCAU CA	5	UGAUGACCAAGCUUGGCAG GC	132
AV00126	GCUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	6	UAGAUGACCAAGCUUGGCA GC	133
AV00127	CCCAAGCUUGGUCAUCUAU GA	7	UCAUAGAUGACCAAGCUUG GG	134

AV00128	GAAGCUUGGUCAUCAUGA CA	8	UGUCAUAGAUGACCAAGCU UC	135
AV00129	GACUACCCAAAUGCUGGCU UA	9	UAAGCCAGCAUUUGGGUAG UC	136
AV00130	GUACCCAAAUGCUGGCUUG AA	10	UUCAAGCCAGCAUUUGGGU AC	137
AV00131	GACCCAAAUGCUGGCUUGA UA	11	UAUCAAGCCAGCAUUUGGG UC	138
AV00132	GGCUCCUUAUUGUUAUACG AA	12	UUCGUUAUACAAUAAGGAG CC	139
AV00133	GGCCUAGAGGCUCCUCCG AA	13	UUCGGAAGGAGCCUCUAGG CC	140
AV00134	GUAGAGGCUCCUCCGAAC AA	14	UUGUUCGGAAGGAGCCUCU AC	141
AV00135	GAAGCACCGACUGAGCAAA GA	15	UCUUUGCUCAGUCGGUGCU UC	142
AV00136	CGAGUGCUACCAUGGUAU GA	16	UCAUUACCAUGGUAGCACU CG	143
AV00137	GGUGCUACCAUGGUAUUGG AA	17	UCCAUAUACCAUGGUAGCA CC	144
AV00138	GACCAUGGUAUUGGACAGA GA	18	UCUCUGUCCAUAUACCAUGG UC	145
AV00139	GUGGUAUUGGACAGAGUUA UA	19	UAUAACUCUGUCCAUAUACC AC	146
AV00140	GGGUAUUGGACAGAGUUAU CA	20	UGAUAACUCUGUCCAUAUAC CC	147
AV00141	CUAUUGGACAGAGUUAUCG AA	21	UUCGAUAACUCUGUCCAUAU AG	148
AV00142	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	22	UUAUGUGCCUCGAUAACUC UC	149
AV00143	CAGUUAUCGAGGCACAUAC UA	23	UAGUAUGUGCCUCGAUAAC UG	150
AV00144	GACCACGGUAUUGGACAGA GA	24	UCUCUGUCCAUAUACCGUGG UC	151

AV00145	GACUGCAGGAAUCCAGAUC CA	25	UGGAUCUGGAUUC CUGCAG UC	152
AV00146	GGGCAGCCCCUUAUUGUUA UA	26	UAUAACAAUAAGGGGCUGC CC	153
AV00147	GAGCCCCUUAUUGUUAUAC GA	27	UCGUUAACAAUAAGGGGC UC	154
AV00148	GCAGUGUCAGGUGGGAGUA CA	28	UGUACUCCCACCUGACACU GC	155
AV00149	CUACUGCAACCUGACACAA UA	29	UAUUGUGUCAGGUUGCAGU AG	156
AV00150	GGACACAAUGCUCAGACGC AA	30	UUGCUCUGAGCAUUGUGU CC	157
AV00151	GUAGAGGCUCCUUCUGAAC AA	31	UUGUUCAGAAGGAGCCUCU AC	158
AV00152	CAGGCUCCUUCUGAACAAG CA	32	UGCUUGUUCAGAAGGAGCC UG	159
AV00153	GAAGCACCAACUGAGCAAA GA	33	UCUUUGCUCAGUUGGUGCU UC	160
AV00154	GGGAAAUGGACAGAGUUAU CA	34	UGAUAACUCUGUCCAUUUC CC	161
AV00155	CAA AUGGACAGAGUUAUCA AA	35	UUUGAUAACUCUGUCCAUU UG	162
AV00156	GGGACAGAGUUAUCAAGGC AA	36	UUGCCUUGAUAACUCUGUC CC	163
AV00157	GUCAAGAACUACUGCCGAA AA	37	UUUUCGGCAGUAGUUCUUG AC	164
AV00158	GCAAGAACUACUGCCGAAA UA	38	UAUUUCGGCAGUAGUUCUU GC	165
AV00159	GAAGAACUACUGCCGAAAU CA	39	UGAUUUCGGCAGUAGUUCU UC	166
AV00160	GACUGCCGAAAUCCAGAUC CA	40	UGGAUCUGGAUUUCGGCAG UC	167
AV00161	CUACUGCAACCUGACACGA UA	41	UAUCGUGUCAGGUUGCAGU AG	168

AV00162	GGACACGAUGCUCAGAUGC AA	42	UUGCAUCUGAGCAUCGUGU CC	169
AV00163	CGACUGCUACUACCAUUAU GA	43	UCAUAAUGGUAGUAGCAGU CG	170
AV00164	CACUGCUACUACCAUUAUG GA	44	UCCAUAAUGGUAGUAGCAG UG	171
AV00165	GCUGCUACUACCAUUAUGG AA	45	UCCAUAAUGGUAGUAGCA GC	172
AV00166	GACUACCAUUAUGGACAGA GA	46	UCUCUGUCCAUAAUGGUAG UC	173
AV00167	GCUUGCCAAGCUUGGUCAU CA	47	UGAUGACCAAGCUUGGCAA GC	174
AV00168	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	48	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	175
AV00169	GAUAGUCGGACCCAGAAA AA	49	UUUUUCUGGGGUCCGACUA UC	176
AV00170	GCAGGAACUACUGCAGGAA UA	50	UAUUCCUGCAGUAGUCCU GC	177
AV00171	CAAUCCAGAUGCUGAGAUAU CA	51	UGAAUCUCAGCAUCUGGAU UG	178
AV00172	CAGAUUCGCCCUUGGUGUU AA	52	UUAACACCAAGGGCGAAUC UG	179
AV00173	CCCCUUGGUGUUACACCAU GA	53	UCAUGGUGUAAACACCAAGG GG	180
AV00174	GUGGUGACAGAAUCAAGUG UA	54	UACACUUGAUUCUGUCACC AC	181
AV00175	GAUCAAGUGUCCUUGCAAC UA	55	UAGUUGCAAGGACACUUGA UC	182
AV00176	CGGGUCCAGGAUUGCUACC AA	56	UUGGUAGCAAUCCUGGACC CG	183
AV00177	GUGUCACAGGAAGGACAUG UA	57	UACAUGUCCUCCUGUGAC AC	184
AV00178	CGAAGGACAUGUCAGUCUU GA	58	UCAAGACUGACAUGUCCUU CG	185

AV00179	CAAGGACAUGUCAGUCUUG GA	59	UCCAAGACUGACAUGUCCU UG	186
AV00180	CUCAGUCUUGGUCCUCUAU GA	60	UCAUAGAGGACCAAGACUG AG	187
AV00181	CUCCUUGGUGUUUAUACCAU GA	61	UCAUGGUUAUACACCAAGG AG	188
AV00182	GUGGUGUUUAUACCAUGGAU CA	62	UGAUCCAUGGUUAUACACC AC	189
AV00183	GGGUGUUUAUACCAUGGAUC CA	63	UGGAUCCAUGGUUAUACAC CC	190
AV00184	CUUAUACCAUGGAUCCCAA UA	64	UAUUGGGAUCCAUGGUUAU AG	191
AV00185	GAUACCAUGGAUCCCAAUG UA	65	UACAUUGGGAUCCAUGGUA UC	192
AV00186	GCCUGACACAAUGUCCAGU GA	66	UCACUGGACAUUGUGUCAG GC	193
AV00187	GGACACAAUGUCCAGUGAC AA	67	UUGUCACUGGACAUUGUGU CC	194
AV00188	GAAUGUCCAGUGACAGAAU CA	68	UGAUUCUGUCACUGGACAU UC	195
AV00189	GAUGUCCAGUGACAGAAUC AA	69	UUGAUUCUGUCACUGGACA UC	196
AV00190	GUGUCCAGUGACAGAAUCA AA	70	UUUGAUUCUGUCACUGGAC AC	197
AV00191	GGUCCAGUGACAGAAUCAA GA	71	UCUUGAUUCUGUCACUGGA CC	198
AV00192	GCAGUGACAGAAUCAAGUG UA	72	UACACUUGAUUCUGUCACU GC	199
AV00193	GAUUCUCCACCACUGUUAC AA	73	UUGUAACAGUGGUGGAGA AUC	200
AV00194	GCCACCACUGUUACAGGAA GA	74	UCUUCCUGUAACAGUGGUG GC	201
AV00195	GACAGAAUACUACCCAAAU GA	75	UCAUUUGGGUAGUAUUCUG UC	202

AV00196	GCAGAAUACUACCCAAAUG GA	76	UCCAUUUGGGUAGUAUUCU GC	203
AV00197	GGAUUCGCCCUUGGUGUUA UA	77	UAUAACACCAAGGGCGAAU CC	204
AV00198	CAUUCGCCCUUGGUGUUAU AA	78	UUAUAACACCAAGGGCGAA UG	205
AV00199	GUCGCCCUUGGUGUUAUAC CA	79	UGGUAUAACACCAAGGGCG AC	206
AV00200	CCCCUUGGUGUUAUACCAU GA	80	UCAUGGUUAUACACCAAGG GG	207
AV00201	GGAUGUCCAGUGACAGAAU CA	81	UGAUUCUGUCACUGGACAU CC	208
AV00202	GCAGAGGCUCCUUCUGAAC AA	82	UUGUUCAGAAGGAGCCUCU GC	209
AV00203	GAUCUUGGUCAUCUAUGAU AA	83	UUAUCAUAGAUGACCAAGA UC	210
AV00204	GGACACAAUGCUCAGAAAC AA	84	UUGUUUCUGAGCAUUGUGU CC	211
AV00205	CCAGUGCUACCAUGGUAU GA	85	UCAUUACCAUGGUAGCACU GG	212
AD00149	CAGCCCUUAUUGUUAUAC GA	86	UCGUUAACAAUAAGGGGC UG	213
AD00150	AGUUAUCGAGGCUCAUUCU CA	87	UGAGAAUGAGCCUCGAUAA CU	214
AD00151	UGACACAAUGCUCAGACGC AA	88	UUGCGUCUGAGCAUUGUGU CA	215
AD00331	GACCCAAAUGCUGGCUUGA UA	89	UAUCAAGCCAGCAUUUGGG UC	216
AD00332	GGGUAUUGGACAGAGUUAU CA	90	UGAUAACUCUGUCCAUAUAC CC	217
AD00333	CUAAUGGACAGAGUUAUCG AA	91	UUCGAUAACUCUGUCCAUAU AG	218
AD00334	CAGUUAUCGAGGCACAUAC UA	92	UAGUAUGUGCCUCGAUAAC UG	219

AD00335	CUACUGCAACCUGACACAA UA	93	UAUUGUGUCAGGUUGCAGU AG	220
AD00336	CGACUGCUACUACCAUUAU GA	94	UCAUAAUGGUAGUAGCAGU CG	221
AD00337	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	95	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	222
AD00338	CAGAUUCGCCCUUGGUGUU AA	96	UUAACACCAAGGGCGAAUC UG	223
AD00339	CGAAGGACAUGUCAGUCUU GA	97	UCAAGACUGACAUGUCCUU CG	224
AD00340	CUCCUUGGUGUUAUACCAU GA	98	UCAUGGUUAUACACCAAGG AG	225
AD00341	CCCCUUGGUGUUAUACCAU GA	99	UCAUGGUUAUACACCAAGG GG	226
AD00342	GGACACAAUGCUCAGAAAC AA	100	UUGUUUCUGAGCAUUGUGU CC	227
AD00433	CUGAUGGACAGAGUUAUCG AA	101	UUCGAUAACUCUGUCCAUC AG	228
AD00434	GGCUCCUUAUUGUUAUACG AA	102	UUCGUUAACAUAAGGAG CC	229
AD00435	GAAGCACCAACUGAGCAAA GA	103	UCUUUGCUCAGUUGGUGCU UC	230
AD00436	GGGAAAUGGACAGAGUUAU CA	104	UGAUAACUCUGUCCAUUUC CC	231
AD00437	GCUGCUACUACCAUUAUGG AA	105	UCCAUAUUGGUAGUAGCA GC	232
AD00438	CAAUCCAGAUGCUGAGAUU CA	106	UGAAUCUCAGCAUCUGGAU UG	233
AD00439	GAUUCUCCACCACUGUUAC AA	107	UUGUAACAGUGGUGGAGA AUC	234
AD00440	GCAGAAUACUACCCAAAUG GA	108	UCCAUUUGGGUAGUAUUCU GC	235
AD00441	GGAUUCGCCCUUGGUGUUA UA	109	UAUAACACCAAGGGCGAAU CC	236

AD00442	CAUUCGCCCUUGGUGUUAU AA	110	UUAUAACACCAAGGGCGAA UG	237
AD00474	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	111	UCCUCGAU AACUCUGUCCA UG	238
AD00475	GCUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	112	UAGAUGACCAAGCUUGGCA GC	239
AD00476	CCCAAGCUUGGUCAUCUAU GA	113	UCAUAGAUGACCAAGCUUG GG	240
AD00477	GGUGCUACCAUGGUA AUGG AA	114	UCCAUAUACCAUGGUAGCA CC	241
AD00478	GACCAUGGUA AUGGACAGA GA	115	UCUCUGUCCAUAUACCAUGG UC	242
AD00479	GUGGUA AUGGACAGAGUUA UA	116	UAUAACUCUGUCCAUAUACC AC	243
AD00480	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	117	UUAUGUGCCUCGAUAACUC UC	244
AD00481	CAA AUGGACAGAGUUAUCA AA	118	UUUGAU AACUCUGUCCAUAU UG	245
AD00482	GGGACAGAGUUAUCAAGGC AA	119	UUGCCUUGAU AACUCUGUC CC	246
AD00483	GAUCAAGUGUCCUUGCAAC UA	120	UAGUUGCAAGGACACUUGA UC	247
AD00484	CGGGUCCAGGAUUGCUACC AA	121	UUGGUAGCAAUCCUGGACC CG	248
AD00485	GUGUCACAGGAAGGACAUG UA	122	UACAUGUCCUCCUGUGAC AC	249
AD00486	GAUGUCCAGUGACAGAAUC AA	123	UUGAUUCUGUCACUGGACA UC	250
AD00487	GCAGAGGCUCCUUCUGAAC AA	124	UUGUUCAGAAGGAGCCUCU GC	251
AD00474- 1	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	125	UCCUCGAU AACUCUGUCCA UG	252
AD00478- 1	GACCAUGGUA AUGGACAGA GA	126	UCUCUGUCCAUAUACCAUGG UC	253
AD00482- 1	GGGACAGAGUUAUCAAGGC AA	127	UUGCCUUGAU AACUCUGUC CC	254

1	AA		CC	
AD00484-1	CGGGUCCAGGAUUGCUACC AA	128	UUGGUAGCAAUCCUGGACC CG	255
AD00474-2	GAUGGACAGAGUUAUCGAG GU	514	ACCUCGAUAACUCUGUCCA UC	608
AV01867	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	515	UUAUGUGCCUCGAUAACUC UC	609
AV01868	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AU	516	AUAUGUGCCUCGAUAACUC UC	610
AV01869	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AC	517	GUAUGUGCCUCGAUAACUC UC	611
AV01870	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AG	518	CUAUGUGCCUCGAUAACUC UC	612
AV01871	GUUAUCGAGGCACAUAA	519	UUAUGUGCCUCGAUAAC	613
AV01872	AGUUAUCGAGGCACAUAA	520	UUAUGUGCCUCGAUAACU	614
AV01873	AAGUUAUCGAGGCACAUAA	521	UUAUGUGCCUCGAUAACUU	615
AV01874	UAGUUAUCGAGGCACAUAA	522	UUAUGUGCCUCGAUAACUA	616
AV01875	GAGUUAUCGAGGCACAUAA	523	UUAUGUGCCUCGAUAACUC	617
AV01876	CAGUUAUCGAGGCACAUAA	524	UUAUGUGCCUCGAUAACUG	618
AV01877	AGAGUUAUCGAGGCACAU A	525	UUAUGUGCCUCGAUAACUC U	619
AV01878	UGAGUUAUCGAGGCACAU A	526	UUAUGUGCCUCGAUAACUC A	620
AV01879	GGAGUUAUCGAGGCACAU A	527	UUAUGUGCCUCGAUAACUC C	621
AV01880	CGAGUUAUCGAGGCACAU A	528	UUAUGUGCCUCGAUAACUC G	622
AV01881	UAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	529	UUAUGUGCCUCGAUAACUC UA	623
AV01882	CAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	530	UUAUGUGCCUCGAUAACUC UG	624
AV01883	AAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	531	UUAUGUGCCUCGAUAACUC UU	625
AV01884	ACAGAGUUAUCGAGGCACA	532	UUAUGUGCCUCGAUAACUC	626

	UAA		UGU	
AV01885	GACAGAGUUAUCGAGGCAC AUAA	533	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UGUC	627
AV01886	GGACAGAGUUAUCGAGGCA CAUAA	534	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UGUCC	628
AV01887	UGGACAGAGUUAUCGAGGC ACAUAA	535	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UGUCCA	629
AV01888	AUGGACAGAGUUAUCGAGG CACAUAA	536	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UGUCCA U	630
AV01889	AUGGUAAUGGACAGAGUUA UCGAGGCACAUAA	537	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UGUCCA U UACCAU	631
AV01890	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	538	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UCU U	632
AV01891	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	539	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UCGA	633
AV01892	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	540	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UC	634
AV01893	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	541	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UC	635
AV01894	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	542	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UC	636
AV01895	GAGAGUUAUCGAGGCGCAU AA	543	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UC	637
AV01896	GAGAGUUAUCGAGGCACAU UA	544	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UC	638
AV01897	GAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	545	UUAUGUGCCUCGAU AACUC UC	639
AV01898	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	546	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	640
AV01899	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UU	547	AAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	641
AV01900	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UC	548	GAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	642
AV01901	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC	549	CAGAUGACCAAGCUUGGCA	643

	UG		AC	
AV01902	CCAAGCUUGGUCAUCUA	550	UAGAUGACCAAGCUUGG	644
AV01903	GCCAAGCUUGGUCAUCUA	551	UAGAUGACCAAGCUUGGC	645
AV01904	AGCCAAGCUUGGUCAUCUA	552	UAGAUGACCAAGCUUGGCU	646
AV01905	UGCCAAGCUUGGUCAUCUA	553	UAGAUGACCAAGCUUGGCA	647
AV01906	GGCCAAGCUUGGUCAUCUA	554	UAGAUGACCAAGCUUGGCC	648
AV01907	CGCCAAGCUUGGUCAUCUA	555	UAGAUGACCAAGCUUGGCG	649
AV01908	AUGCCAAGCUUGGUCAUCU A	556	UAGAUGACCAAGCUUGGCA U	650
AV01909	UUGCCAAGCUUGGUCAUCU A	557	UAGAUGACCAAGCUUGGCA A	651
AV01910	GUGCCAAGCUUGGUCAUCU A	558	UAGAUGACCAAGCUUGGCA C	652
AV01911	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU A	559	UAGAUGACCAAGCUUGGCA G	653
AV01912	UUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	560	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AA	654
AV01913	CUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	561	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AG	655
AV01914	AUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	562	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AU	656
AV01915	ACUUGCCAAGCUUGGUCAU CUA	563	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AGU	657
AV01916	AACUUGCCAAGCUUGGUCA UCUA	564	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AGUU	658
AV01917	GAACUUGCCAAGCUUGGUC AUCUA	565	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AGUUC	659
AV01918	AGAACUUGCCAAGCUUGGU CAUCUA	566	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AGUUCU	660
AV01919	AAGAACUUGCCAAGCUUGG UCAUCUA	567	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AGUUCUU	661
AV01920	CACAGGAAGAACUUGCCAA GCUUGGUCAUCUA	568	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AGUUCUCCUGUG	662
AV01921	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC	569	UAGAUGACCAAGCUUGGCA	663

	UA		ACUU	
AV01922	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	570	UAGAUGACCAAGCUUGGCA ACGA	664
AV01923	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	571	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	665
AV01924	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	572	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	666
AV01925	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	573	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	667
AV01926	GUUGCCAAGCUUGGUUAUC UA	574	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	668
AV01927	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC CA	575	UGGAUGACCAAGCUUGGCA AC	669
AV01928	GUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	576	UAGAUGACCAAGCUUGGCA AC	670
AV01929	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	577	UCCUCGAU AACUCUGUCCA UG	671
AV01930	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GU	578	ACCUCGAU AACUCUGUCCA UG	672
AV01931	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GC	579	GCCUCGAU AACUCUGUCCA UG	673
AV01932	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GG	580	CCCUCGAU AACUCUGUCCA UG	674
AV01933	GACAGAGUUAUCGAGGA	581	UCCUCGAU AACUCUGUC	675
AV01934	GGACAGAGUUAUCGAGGA	582	UCCUCGAU AACUCUGUCC	676
AV01935	AGGACAGAGUUAUCGAGGA	583	UCCUCGAU AACUCUGUCCU	677
AV01936	UGGACAGAGUUAUCGAGGA	584	UCCUCGAU AACUCUGUCCA	678
AV01937	GGGACAGAGUUAUCGAGGA	585	UCCUCGAU AACUCUGUCCC	679
AV01938	CGGACAGAGUUAUCGAGGA	586	UCCUCGAU AACUCUGUCCG	680
AV01939	AUGGACAGAGUUAUCGAGG A	587	UCCUCGAU AACUCUGUCCA U	681
AV01940	UUGGACAGAGUUAUCGAGG A	588	UCCUCGAU AACUCUGUCCA A	682
AV01941	GUGGACAGAGUUAUCGAGG	589	UCCUCGAU AACUCUGUCCA	683

	A		C	
AV01942	CUGGACAGAGUUAUCGAGG A	590	UCCUCGAUAACUCUGUCCA G	684
AV01943	UAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	591	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UA	685
AV01944	GAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	592	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UC	686
AV01945	AAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	593	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UU	687
AV01946	UGAUGGACAGAGUUAUCGA GGA	594	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UCA	688
AV01947	GUGAUGGACAGAGUUAUCG AGGA	595	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UCAC	689
AV01948	GGUGAUGGACAGAGUUAUC GAGGA	596	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UCACC	690
AV01949	UGGUGAUGGACAGAGUUAU CGAGGA	597	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UCACCA	691
AV01950	AUGGUGAUGGACAGAGUUA UCGAGGA	598	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UCACCAU	692
AV01951	GCUACCAUGGUGAUGGACA GAGUUAUCGAGGA	599	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UCACCAUGGUAGC	693
AV01952	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	600	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UGUU	694
AV01953	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	601	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UGGA	695
AV01954	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	602	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UG	696
AV01955	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	603	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UG	697
AV01956	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	604	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UG	698
AV01957	CAUGGACAGAGUUAUUGAG GA	605	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UG	699
AV01958	CAUGGACAGAGUUAUCGAG	606	UUCUCGAUAACUCUGUCCA	700

	AA		UG	
AV01959	CAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	607	UCCUCGAUAACUCUGUCCA UG	701

В таблице 2 показаны последовательности антисмысловой и смысловой нитей определенных химически модифицированных средств для RNAi LPA по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению в клетки и/или субъектам вводят средства для RNAi, имеющие полинуклеотидные последовательности, показанные в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению субъектам вводят средства для RNAi, имеющие полинуклеотидные последовательности, показанные в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вводимое субъекту средство для RNAi содержит дуплекс, отмеченный в первом столбце таблицы 2, и модификации последовательности в последовательностях смысловой и антисмысловой нитей, показанные в третьем и шестом столбцах одной и той же строки таблицы 2 соответственно. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению последовательности, показанные в таблице 2, могут быть присоединены к соединениям (что в данном документе также называют "конъюгированы с соединениями"), которые способны доставлять средства для RNAi в клетки и/или ткани субъекта. Неограничивающими примерами соединений для доставки, которые могут быть использованы в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, являются GalNAc-содержащие соединения. В таблице 2 в первом столбце представлен ADN₂ дуплекса последовательности оснований, соответствующий таблице 1. Последовательности оснований, указанные с помощью ADN₂ дуплекса, не только демонстрируют последовательности оснований, содержащиеся в смысловой и антисмысловой нитях, но также имеют обозначенные химические модификации, показанные в той же строке таблицы 2. Например, в первой строке таблицы 1 показаны смысловые и антисмысловые одонитевые последовательности оснований, которые вместе образуют дуплекс, указанный как дуплекс AV00122; дуплекс AV00122, указанный в таблице 2 как дуплекс, содержит последовательности оснований AV00122-SS и AV00122-AS и содержит химические модификации смысловых последовательностей и антисмысловых последовательностей, показанных в третьем и шестом столбцах соответственно. "SS№ смысловой нити" во втором столбце таблицы 2 представляет собой назначенный идентификатор смысловой последовательности (включая модификацию), показанной в третьем столбце той же строки. "AS№ антисмысловой нити" в пятом столбце таблицы 2 представляет собой назначенный идентификатор антисмысловой последовательности (включая модификацию), показанной в шестом столбце.

Таблица 2. Последовательности антисмысловой и смысловой нитей химически модифицированного средства для RNAi LPA. Все последовательности показаны в направлении от 5' к 3'. Данные последовательности применяли в некоторых из описанных

в данном документе тестовых исследованиях *in vitro*. Химические модификации обозначены следующим образом: заглавные буквы - 2'-фтор; строчные буквы - 2'-ОМе; фосфоротиоат - *

AV№ дуплекса	SS№ смысловой цепи	Смысловая последовательность	SEQ ID NO	ASN№ антисмысловой нити	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO
AV001 22	AV00122 -SS	c*u*gguccaGgAuUgc uacca*a	256	AV00122- AS	u*U*gguaGcaauCcUg Gacc*a*g	340
AV001 23	AV00123 -SS	c*u*gauggaCaGaGuu aucga*a	257	AV00123- AS	u*U*cgauAacucUgUc Cauc*a*g	341
AV001 24	AV00124 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*a	258	AV00124- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	342
AV001 25	AV00125 -SS	g*c*cugccaAgCuUgg ucauc*a	259	AV00125- AS	u*G*augaCcaagCuUg Gcag*g*c	343
AV001 26	AV00126 -SS	g*c*ugccaaGcUuGgu caucu*a	260	AV00126- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggca*g*c	344
AV001 27	AV00127 -SS	c*c*caagcuUgGuCau cuaug*a	261	AV00127- AS	u*C*auagAugacCaAg Cuug*g*g	345
AV001 28	AV00128 -SS	g*a*agcuugGuCaUcu augac*a	262	AV00128- AS	u*G*ucauAgaugAcCa Agcu*u*c	346
AV001 29	AV00129 -SS	g*a*cuaccAaAuGcu ggcuu*a	263	AV00129- AS	u*A*agccAgcauUuGg Guag*u*c	347
AV001 30	AV00130 -SS	g*u*acccaaAuGcUgg cuuga*a	264	AV00130- AS	u*U*caagCcagcAuUu Gggg*a*c	348
AV001 31	AV00131 -SS	g*a*ccaaaUgCuGgc uugau*a	265	AV00131- AS	u*A*ucaaGccagCaUu Uggg*u*c	349
AV001 32	AV00132 -SS	g*g*cuccuuAuUgUua uacga*a	266	AV00132- AS	u*U*cguaUaacaAuAa Ggag*c*c	350
AV001 33	AV00133 -SS	g*g*ccuagaGgCuCcu uccga*a	267	AV00133- AS	u*U*cggaAggagCcUc Uagg*c*c	351
AV001 34	AV00134 -SS	g*u*agaggcUcCuUcc gaaca*a	268	AV00134- AS	u*U*guucGgaagGaGc Cucu*a*c	352
AV001 35	AV00135 -SS	g*a*agcaccGaCuGag	269	AV00135- AS	u*C*uuugCucagUcGg	353

35	-SS	caaag*a		AS	Ugcu*u*c	
AV001	AV00136	c*g*agugcuAcCaUgg	270	AV00136-	u*C*auuaCcaugGuAg	354
36	-SS	uaaug*a		AS	Cacu*c*g	
AV001	AV00137	g*g*ugcuacCaUgGua	271	AV00137-	u*U*ccauUaccaUgGu	355
37	-SS	augga*a		AS	Agca*c*c	
AV001	AV00138	g*a*ccauggUaAuGga	272	AV00138-	u*C*ucugUccauUaCc	356
38	-SS	cagag*a		AS	Augg*u*c	
AV001	AV00139	g*u*gguaauGgAcAga	273	AV00139-	u*A*uaacUcuguCcAu	357
39	-SS	guuau*a		AS	Uacc*a*c	
AV001	AV00140	g*g*guaaugGaCaGag	274	AV00140-	u*G*auaaCucugUcCa	358
40	-SS	uuau*c*a		AS	Uuac*c*c	
AV001	AV00141	c*u*aauggaCaGaGuu	275	AV00141-	u*U*cgauAacucUgUc	359
41	-SS	aucga*a		AS	Cauu*a*g	
AV001	AV00142	g*a*gaguuaUcGaGgc	276	AV00142-	u*U*auguGccucGaUa	360
42	-SS	acaua*a		AS	Acuc*u*c	
AV001	AV00143	c*a*guuauGgGcCac	277	AV00143-	u*A*guauGugccUcGa	361
43	-SS	auacu*a		AS	Uaac*u*g	
AV001	AV00144	g*a*ccacggUaAuGga	278	AV00144-	u*C*ucugUccauUaCc	362
44	-SS	cagag*a		AS	Gugg*u*c	
AV001	AV00145	g*a*cugcagGaAuCca	279	AV00145-	u*G*gaucUggauUcCu	363
45	-SS	gaucc*a		AS	Gcag*u*c	
AV001	AV00146	g*g*gcagccCcUuAu	280	AV00146-	u*A*uaacAauaaGgGg	364
46	-SS	guuau*a		AS	Cugc*c*c	
AV001	AV00147	g*a*gccccUaUuGuu	281	AV00147-	u*C*guauAacaaUaAg	365
47	-SS	auacg*a		AS	Gggc*u*c	
AV001	AV00148	g*c*agugucAgGuGg	282	AV00148-	u*G*uacuCccacCuGa	366
48	-SS	gaguac*a		AS	Cacu*g*c	
AV001	AV00149	c*u*acugcaAcCuGac	283	AV00149-	u*A*uuguGucagGuU	367
49	-SS	acaau*a		AS	gCagu*a*g	
AV001	AV00150	g*g*acacaaUgCuCag	284	AV00150-	u*U*gcguCugagCaUu	368
50	-SS	acgca*a		AS	Gugu*c*c	
AV001	AV00151	g*u*agaggcUcCuUcu	285	AV00151-	u*U*guucAgaagGaGc	369
51	-SS	gaaca*a		AS	Cucu*a*c	
AV001	AV00152	c*a*ggcuccUuCuGaa	286	AV00152-	u*G*cuugUucagAaGg	370

52	-SS	caagc*a		AS	Agcc*u*g	
AV001	AV00153	g*a*agcaccAaCuGag	287	AV00153-	u*C*uuugCucagUuGg	371
53	-SS	caaag*a		AS	Ugcu*u*c	
AV001	AV00154	g*g*gaaaugGaCaGag	288	AV00154-	u*G*auaaCucugUcCa	372
54	-SS	uuauca*a		AS	Uuuc*c*c	
AV001	AV00155	c*a*aauggaCaGaGuu	289	AV00155-	u*U*ugauAacucUgUc	373
55	-SS	aucaa*a		AS	Cauu*u*g	
AV001	AV00156	g*g*gacagaGuUaUca	290	AV00156-	u*U*gccuUgauaAcUc	374
56	-SS	aggca*a		AS	Uguc*c*c	
AV001	AV00157	g*u*caagaaCuAcUgc	291	AV00157-	u*U*uuugGcaguAgUu	375
57	-SS	cgaaa*a		AS	Cuug*a*c	
AV001	AV00158	g*c*aagaacUaCuGcc	292	AV00158-	u*A*uuucGgcagUaGu	376
58	-SS	gaaau*a		AS	Ucuu*g*c	
AV001	AV00159	g*a*agaacuAcUgCcg	293	AV00159-	u*G*auuuCggcaGuAg	377
59	-SS	aaauc*a		AS	Uucu*u*c	
AV001	AV00160	g*a*cugccgAaAuCca	294	AV00160-	u*G*gaucUggauUuGg	378
60	-SS	gaucc*a		AS	Gcag*u*c	
AV001	AV00161	c*u*acugcaAcCuGac	295	AV00161-	u*A*ucguGucagGuUg	379
61	-SS	acgau*a		AS	Cagu*a*g	
AV001	AV00162	g*g*acacgaUgCuCag	296	AV00162-	u*U*gcauGugagCaUc	380
62	-SS	augca*a		AS	Gugu*c*c	
AV001	AV00163	c*g*acugcuAcUaCca	297	AV00163-	u*C*auaaUgguaGuAg	381
63	-SS	uuauca*a		AS	Cagu*c*g	
AV001	AV00164	c*a*cugcuaCuAcCau	298	AV00164-	u*C*cauaAugguAgUa	382
64	-SS	uaugg*a		AS	Gcag*u*g	
AV001	AV00165	g*c*ugcuacUaCcAuu	299	AV00165-	u*U*ccauAauggUaGu	383
65	-SS	augga*a		AS	Agca*g*c	
AV001	AV00166	g*a*cuaccaUuAuGga	300	AV00166-	u*C*ucugUccauAaUg	384
66	-SS	cagag*a		AS	Guag*u*c	
AV001	AV00167	g*c*uuugccaAgCuUgg	301	AV00167-	u*G*augaCcaagCuUg	385
67	-SS	ucauc*a		AS	Gcaa*g*c	
AV001	AV00168	g*u*ugccaaGcUuGgu	302	AV00168-	u*A*gaugAccaaGcUu	386
68	-SS	caucu*a		AS	Ggca*a*c	
AV001	AV00169	g*a*uaugcgGaCcCca	303	AV00169-	u*U*uuucUggggUcCg	387

69	-SS	gaaaa*a		AS	Acua*u*c	
AV001 70	AV00170 -SS	g*c*aggaacUaCuGca ggaau*a	304	AV00170- AS	u*A*uuccUgcagUaGu Uccu*g*c	388
AV001 71	AV00171 -SS	c*a*auccagAuGcUga gauuc*a	305	AV00171- AS	u*G*auucUcagcAuCu Ggau*u*g	389
AV001 72	AV00172 -SS	c*a*gauucgCcCuUgg uguua*a	306	AV00172- AS	u*U*aacaCcaagGgCg Aauc*u*g	390
AV001 73	AV00173 -SS	c*c*ccuuggUgUuAca ccaug*a	307	AV00173- AS	u*C*auuggUguaaCaCc Aagg*g*g	391
AV001 74	AV00174 -SS	g*u*ggugacAgAaUca agugu*a	308	AV00174- AS	u*A*cacuUgauuCuGu Cacc*a*c	392
AV001 75	AV00175 -SS	g*a*ucaaguGuCcUug caacu*a	309	AV00175- AS	u*A*guugCaaggAcAc Uuga*u*c	393
AV001 76	AV00176 -SS	c*g*gguccaGgAuUgc uacca*a	310	AV00176- AS	u*U*gguaGcaauCcUg Gacc*c*g	394
AV001 77	AV00177 -SS	g*u*gucacaGgAaGga caugu*a	311	AV00177- AS	u*A*caugUccuuCcUg Ugac*a*c	395
AV001 78	AV00178 -SS	c*g*aaggacAuGuCag ucuug*a	312	AV00178- AS	u*C*aagaCugacAuGu Ccuu*c*g	396
AV001 79	AV00179 -SS	c*a*aggacaUgUcAgu cuugg*a	313	AV00179- AS	u*C*caagAcugaCaUg Uccu*u*g	397
AV001 80	AV00180 -SS	c*u*cagucuUgGuCcu cuaug*a	314	AV00180- AS	u*C*auagAggacCaAg Acug*a*g	398
AV001 81	AV00181 -SS	c*u*ccuuggUgUuAua ccaug*a	315	AV00181- AS	u*C*auuggUauaaCaCc Aagg*a*g	399
AV001 82	AV00182 -SS	g*u*gguguuAuAcCa uggauc*a	316	AV00182- AS	u*G*auccAugguAuAa Cacc*a*c	400
AV001 83	AV00183 -SS	g*g*guguuaUaCcAug gaucc*a	317	AV00183- AS	u*G*gaucCauggUaUa Acac*c*c	401
AV001 84	AV00184 -SS	c*u*uauaccAuGgAuc ccaau*a	318	AV00184- AS	u*A*uuggGauccAuGg Uaua*a*g	402
AV001 85	AV00185 -SS	g*a*uaccAuGgAuCcc aaugu*a	319	AV00185- AS	u*A*cauuGggauCcAu Ggua*u*c	403
AV001	AV00186	g*c*cugacaCaAuGuc	320	AV00186-	u*C*acugGacauUgUg	404

86	-SS	cagug*a		AS	Ucag*g*c	
AV001 87	AV00187 -SS	g*g*acacaaUgUcCag ugaca*a	321	AV00187- AS	u*U*gucaCuggaCaUu Gugu*c*c	405
AV001 88	AV00188 -SS	g*a*auguccAgUgAca gaauc*a	322	AV00188- AS	u*G*auucUgucaCuGg Acau*u*c	406
AV001 89	AV00189 -SS	g*a*uguccaGuGaCag aauca*a	323	AV00189- AS	u*U*gauuCugucAcUg Gaca*u*c	407
AV001 90	AV00190 -SS	g*u*guccagUgAcAga aucaa*a	324	AV00190- AS	u*U*ugauUcuguCaCu Ggac*a*c	408
AV001 91	AV00191 -SS	g*g*uccaguGaCaGaa ucaag*a	325	AV00191- AS	u*C*uugaUucugUcAc Ugga*c*c	409
AV001 92	AV00192 -SS	g*c*agugacAgAaUca agugu*a	326	AV00192- AS	u*A*cacuUgauuCuGu Cacu*g*c	410
AV001 93	AV00193 -SS	g*a*uucuccAcCaCug uuaca*a	327	AV00193- AS	u*U*guaaCagugGuGg Aga*u*c	411
AV001 94	AV00194 -SS	g*c*caccacUgUuAca ggaag*a	328	AV00194- AS	u*C*uuccUguaaCaGu Ggug*g*c	412
AV001 95	AV00195 -SS	g*a*cagaauAcUaCcc aaaug*a	329	AV00195- AS	u*C*auuuGgguaGuAu Ucug*u*c	413
AV001 96	AV00196 -SS	g*c*agaauaCuAcCca aaugg*a	330	AV00196- AS	u*C*cauuUggguAgUa Uucu*g*c	414
AV001 97	AV00197 -SS	g*g*auucgcCcUuGgu guuau*a	331	AV00197- AS	u*A*uaacAccaaGgGc Gauu*c*c	415
AV001 98	AV00198 -SS	c*a*uucgccCuUgGug uuaua*a	332	AV00198- AS	u*U*auaaCaccaAgGg Cgaa*u*g	416
AV001 99	AV00199 -SS	g*u*cgcccuUgGuGuu auacc*a	333	AV00199- AS	u*G*guauAacacCaAg Ggcg*a*c	417
AV002 00	AV00200 -SS	c*c*ccuuggUgUuAua ccaug*a	334	AV00200- AS	u*C*auuuGgguaGuAu Aagg*g*g	418
AV002 01	AV00201 -SS	g*g*auguccAgUgAca gaauc*a	335	AV00201- AS	u*G*auucUgucaCuGg Acau*c*c	419
AV002 02	AV00202 -SS	g*c*agaggcUcCuUcu gaaca*a	336	AV00202- AS	u*U*guucAgaagGaGc Cucu*g*c	420
AV002	AV00203	g*a*ucuuggUcAuCua	337	AV00203-	u*U*aucaUagauGaCc	421

03	-SS	ugaua*a		AS	Aaga*u*c	
AV00204	AV00204	g*g*acacaaUgCuCag	338	AV00204-	u*U*guuuCugagCaUu	422
04	-SS	aaaca*a		AS	Gugu*c*c	
AV00205	AV00205	c*c*agugcuAcCaUgg	339	AV00205-	u*C*auuaCcaugGuAg	423
05	-SS	uaaug*a		AS	Cacu*g*g	
AV01867	AV01867	g*a*gaguuaUcGaGgc	702	AV01867-	u*U*auguGccucGaUa	795
67	-SS	acaua*a		AS	Acuc*u*c	
AV01868	AV01868	g*a*gaguuaUcGaGgc	703	AV01868-	a*U*auguGccucGaUa	796
68	-SS	acaua*u		AS	Acuc*u*c	
AV01869	AV01869	g*a*gaguuaUcGaGgc	704	AV01869-	g*U*auguGccucGaUa	797
69	-SS	acaua*c		AS	Acuc*u*c	
AV01870	AV01870	g*a*gaguuaUcGaGgc	705	AV01870-	c*U*auguGccucGaUa	798
70	-SS	acaua*g		AS	Acuc*u*c	
AV01871	AV01871	g*u*uaUcGaGgcacau	706	AV01871-	u*U*auguGccucGaUa	799
71	-SS	a*a		AS	*A*c	
AV01872	AV01872	a*g*uuuUcGaGgcaca	707	AV01872-	u*U*auguGccucGaUa	800
72	-SS	ua*a		AS	A*c*u	
AV01873	AV01873	a*a*guuaUcGaGgcac	708	AV01873-	u*U*auguGccucGaUa	801
73	-SS	aua*a		AS	Ac*u*u	
AV01874	AV01874	u*a*guuaUcGaGgcac	709	AV01874-	u*U*auguGccucGaUa	802
74	-SS	aua*a		AS	Ac*u*a	
AV01875	AV01875	g*a*guuaUcGaGgcac	710	AV01875-	u*U*auguGccucGaUa	803
75	-SS	aua*a		AS	Ac*u*c	
AV01876	AV01876	c*a*guuaUcGaGgcac	711	AV01876-	u*U*auguGccucGaUa	804
76	-SS	aua*a		AS	Ac*u*g	
AV01877	AV01877	a*g*aguuaUcGaGgca	712	AV01877-	u*U*auguGccucGaUa	805
77	-SS	caua*a		AS	Acu*c*u	
AV01878	AV01878	u*g*aguuaUcGaGgca	713	AV01878-	u*U*auguGccucGaUa	806
78	-SS	caua*a		AS	Acu*c*a	
AV01879	AV01879	g*g*aguuaUcGaGgca	714	AV01879-	u*U*auguGccucGaUa	807
79	-SS	caua*a		AS	Acu*c*c	
AV01880	AV01880	c*g*aguuaUcGaGgca	715	AV01880-	u*U*auguGccucGaUa	808
80	-SS	caua*a		AS	Acu*c*g	
AV01881	AV01881	u*a*gaguuaUcGaGgc	716	AV01881-	u*U*auguGccucGaUa	809

81	-SS	acaua*a		AS	Acuc*u*a	
AV018	AV01882	c*a*gaguuaUcGaGgc	717	AV01882-	u*U*auguGccucGaUa	810
82	-SS	acaua*a		AS	Acuc*u*g	
AV018	AV01883	a*a*gaguuaUcGaGgc	718	AV01883-	u*U*auguGccucGaUa	811
83	-SS	acaua*a		AS	Acuc*u*u	
AV018	AV01884	a*c*agaguuaUcGaGg	719	AV01884-	u*U*auguGccucGaUa	812
84	-SS	cacaua*a		AS	Acucu*g*u	
AV018	AV01885	g*a*cagaguuaUcGaG	720	AV01885-	u*U*auguGccucGaUa	813
85	-SS	gcacaua*a		AS	Acucug*u*c	
AV018	AV01886	g*g*acagaguuaUcGa	721	AV01886-	u*U*auguGccucGaUa	814
86	-SS	Ggcacaua*a		AS	Acucugu*c*c	
AV018	AV01887	u*g*gacagaguuaUcG	722	AV01887-	u*U*auguGccucGaUa	815
87	-SS	aGgcacaua*a		AS	Acucuguc*c*a	
AV018	AV01888	a*u*ggacagaguuaUc	723	AV01888-	u*U*auguGccucGaUa	816
88	-SS	GaGgcacaua*a		AS	Acucugucc*a*u	
AV018	AV01889	a*u*gguauggacagag	724	AV01889-	u*U*auguGccucGaUa	817
89	-SS	uuuUcGaGgcacaua*a		AS	Acucuguccauuacc*a*u	
AV018	AV01890	g*a*gaguuaUcGaGgc	725	AV01890-	u*U*auguGccucGaUa	818
90	-SS	acaua*a		AS	Acucuc*u*u	
AV018	AV01891	g*a*gaguuaUcGaGgc	726	AV01891-	u*U*auguGccucGaUa	819
91	-SS	acaua*a		AS	Acucuc*g*a	
AV018	AV01892	g*a*gaguuaUcGaGgc	727	AV01892-	u*U*aug(uUNA)Gccu	820
92	-SS	acaua*a		AS	cGaUaAcuc*u*c	
AV018	AV01893	g*a*gaguuaUcGaGgc	728	AV01893-	u*U*augu(gUNA)ccu	821
93	-SS	acaua*a		AS	cGaUaAcuc*u*c	
AV018	AV01894	g*a*gaguuaUCGaggc	729	AV01894-	u*U*augUgccucgaUa	822
94	-SS	acaua*a		AS	Acuc*u*c	
AV018	AV01895	g*a*gaguuaUcGaGgc	730	AV01895-	u*U*auguGccucGaUa	823
95	-SS	gcaua*a		AS	Acuc*u*c	
AV018	AV01896	g*a*gaguuaUcGaGgc	731	AV01896-	u*A*auguGccucGaUa	824
96	-SS	acauu*a		AS	Acuc*u*c	
AV018	AV01897	g*a*gaguuaUcGaGgc	732	AV01897-	u*U*auguGccucGaUa	825
97	-SS	acau*a*a		AS	Acuc*u*c	
AV018	AV01898	g*u*ugccaaGcUuGgu	733	AV01898-	u*A*gaugAccaaGcUu	826
98	-SS	caucu*a		AS	Ggca*a*c	

AV01899	AV01899-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*u	734	AV01899-AS	a*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	827
AV01900	AV01900-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*c	735	AV01900-AS	g*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	828
AV01901	AV01901-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*g	736	AV01901-AS	c*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	829
AV01902	AV01902-SS	c*c*aaGcUuGgucaucu*a	737	AV01902-AS	u*A*gaugAccaaGcUu*G*g	830
AV01903	AV01903-SS	g*c*caaGcUuGgucaucu*a	738	AV01903-AS	u*A*gaugAccaaGcUuG*g*c	831
AV01904	AV01904-SS	a*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	739	AV01904-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*u	832
AV01905	AV01905-SS	u*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	740	AV01905-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*a	833
AV01906	AV01906-SS	g*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	741	AV01906-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*c	834
AV01907	AV01907-SS	c*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	742	AV01907-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*g	835
AV01908	AV01908-SS	a*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	743	AV01908-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*u	836
AV01909	AV01909-SS	u*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	744	AV01909-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*a	837
AV01910	AV01910-SS	g*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	745	AV01910-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*c	838
AV01911	AV01911-SS	c*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	746	AV01911-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*g	839
AV01912	AV01912-SS	u*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	747	AV01912-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*a	840
AV01913	AV01913-SS	c*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	748	AV01913-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*g	841
AV01914	AV01914-SS	a*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	749	AV01914-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*u	842
AV01915	AV01915-SS	a*c*uugccaaGcUuGgucaucu*a	750	AV01915-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaa*g*u	843

AV019 16	AV01916 -SS	a*a*cuugccaaGcUuG gucaucu*a	751	AV01916- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaag*u*u	844
AV019 17	AV01917 -SS	g*a*acuugccaaGcUu Ggucaucu*a	752	AV01917- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaagu*u*c	845
AV019 18	AV01918 -SS	a*g*aacuugccaaGcUu Ggucaucu*a	753	AV01918- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaagu*c*u	846
AV019 19	AV01919 -SS	a*a*gaacuugccaaGcU uGgucaucu*a	754	AV01919- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaaguuc*u*u	847
AV019 20	AV01920 -SS	c*a*caggaagaacuugcc aaGcUuGgucaucu*a	755	AV01920- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaaguucuccug*u* g	848
AV019 21	AV01921 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu caucu*a	756	AV01921- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaac*u*u	849
AV019 22	AV01922 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu caucu*a	757	AV01922- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggcaac*g*a	850
AV019 23	AV01923 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu caucu*a	758	AV01923- AS	u*A*gau(gUNA)Acca aGcUuGgca*a*c	851
AV019 24	AV01924 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu caucu*a	759	AV01924- AS	u*A*gaug(aUNA)ccaa GcUuGgca*a*c	852
AV019 25	AV01925 -SS	g*u*ugccaaGCUuggu caucu*a	760	AV01925- AS	u*A*gauGaccaagcUu Ggca*a*c	853
AV019 26	AV01926 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu uauucu*a	761	AV01926- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggca*a*c	854
AV019 27	AV01927 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu caucc*a	762	AV01927- AS	u*G*gaugAccaaGcUu Ggca*a*c	855
AV019 28	AV01928 -SS	g*u*ugccaaGcUuGgu cauc*u*a	763	AV01928- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggca*a*c	856
AV019 29	AV01929 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*a	764	AV01929- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	857
AV019 30	AV01930 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*u	765	AV01930- AS	a*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	858
AV019 31	AV01931 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*c	766	AV01931- AS	g*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	859
AV019	AV01932	c*a*uggacaGaGuUau	767	AV01932-	c*C*cucgAuaacUcUg	860

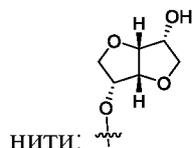
32	-SS	cgagg*g		AS	Ucca*u*g	
AV019	AV01933	g*a*caGaGuUaucgag	768	AV01933-	u*C*cucgAuaacUcUg	861
33	-SS	g*a		AS	*U*c	
AV019	AV01934	g*g*acaGaGuUaucga	769	AV01934-	u*C*cucgAuaacUcUg	862
34	-SS	gg*a		AS	U*c*c	
AV019	AV01935	a*g*gacaGaGuUaucg	770	AV01935-	u*C*cucgAuaacUcUg	863
35	-SS	agg*a		AS	Uc*c*u	
AV019	AV01936	u*g*gacaGaGuUaucg	771	AV01936-	u*C*cucgAuaacUcUg	864
36	-SS	agg*a		AS	Uc*c*a	
AV019	AV01937	g*g*gacaGaGuUaucg	772	AV01937-	u*C*cucgAuaacUcUg	865
37	-SS	agg*a		AS	Uc*c*c	
AV019	AV01938	c*g*gacaGaGuUaucg	773	AV01938-	u*C*cucgAuaacUcUg	866
38	-SS	agg*a		AS	Uc*c*g	
AV019	AV01939	a*u*ggacaGaGuUauc	774	AV01939-	u*C*cucgAuaacUcUg	867
39	-SS	gagg*a		AS	Ucc*a*u	
AV019	AV01940	u*u*ggacaGaGuUauc	775	AV01940-	u*C*cucgAuaacUcUg	868
40	-SS	gagg*a		AS	Ucc*a*a	
AV019	AV01941	g*u*ggacaGaGuUauc	776	AV01941-	u*C*cucgAuaacUcUg	869
41	-SS	gagg*a		AS	Ucc*a*c	
AV019	AV01942	c*u*ggacaGaGuUauc	777	AV01942-	u*C*cucgAuaacUcUg	870
42	-SS	gagg*a		AS	Ucc*a*g	
AV019	AV01943	u*a*uggacaGaGuUau	778	AV01943-	u*C*cucgAuaacUcUg	871
43	-SS	cgagg*a		AS	Ucca*u*a	
AV019	AV01944	g*a*uggacaGaGuUau	779	AV01944-	u*C*cucgAuaacUcUg	872
44	-SS	cgagg*a		AS	Ucca*u*c	
AV019	AV01945	a*a*uggacaGaGuUau	780	AV01945-	u*C*cucgAuaacUcUg	873
45	-SS	cgagg*a		AS	Ucca*u*u	
AV019	AV01946	u*g*auggacaGaGuUa	781	AV01946-	u*C*cucgAuaacUcUg	874
46	-SS	ucgagg*a		AS	Uccau*c*a	
AV019	AV01947	g*u*gauggacaGaGuU	782	AV01947-	u*C*cucgAuaacUcUg	875
47	-SS	aucgagg*a		AS	Uccauc*a*c	
AV019	AV01948	g*g*ugauggacaGaGu	783	AV01948-	u*C*cucgAuaacUcUg	876
48	-SS	Uaucgagg*a		AS	Uccauc*a*c	
AV019	AV01949	u*g*gugauggacaGaG	784	AV01949-	u*C*cucgAuaacUcUg	877

49	-SS	uUaucgagg*a		AS	Uccaucac*c*a	
AV019 50	AV01950 -SS	a*u*ggugauggacaGa GuUaucgagg*a	785	AV01950- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Uccaucacc*a*u	878
AV019 51	AV01951 -SS	g*c*uaccauggugaugg acaGaGuUaucgagg*a	786	AV01951- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Uccaucaccauggua*g*c	879
AV019 52	AV01952 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*a	787	AV01952- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Uccaug*u*u	880
AV019 53	AV01953 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*a	788	AV01953- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Uccaug*g*a	881
AV019 54	AV01954 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*a	789	AV01954- AS	u*C*cuc(gUNA)Auaa cUcUgUcca*u*g	882
AV019 55	AV01955 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgagg*a	790	AV01955- AS	u*C*cucg(aUNA)uaac UcUgUcca*u*g	883
AV019 56	AV01956 -SS	c*a*uggacaGAGuuau cgagg*a	791	AV01956- AS	u*C*cucGauaacucUg Ucca*u*g	884
AV019 57	AV01957 -SS	c*a*uggacaGaGuUau ugagg*a	792	AV01957- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	885
AV019 58	AV01958 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgaga*a	793	AV01958- AS	u*U*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	886
AV019 59	AV01959 -SS	c*a*uggacaGaGuUau cgag*g*a	794	AV01959- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	887

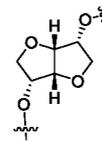
В таблице 3 показаны последовательности антисмысловой и смысловой нитей определенных химически модифицированных средств для RNAi LPA по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению средства для RNAi, показанные в таблице 3, вводят в клетки и/или субъектам. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению субъектам вводят средства для RNAi, имеющие полинуклеотидные последовательности, показанные в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вводимое субъекту средство для RNAi содержит дуплекс, указанный в первом столбце таблицы 3, и содержит модификации последовательности и/или соединения для доставки, показанные в последовательностях смысловой и антисмысловой нитей в третьем и шестом столбцах той же строки в таблице 3 соответственно. Данную последовательность применяют в некоторых тестовых исследованиях *in vivo*, описанных в другом месте в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению последовательности, показанные в таблице 3, могут быть связаны (что в данном документе также называют "конъюгированы с") с соединениями для доставки,

неограничивающим примером которых являются GalNAc-содержащие соединения, т. е. содержат соединение для доставки, помеченное "GLX-n" на смысловой нити из третьего столбца в таблице 3. Используемый в данном документе и показанный в таблице 3 "GLX-n" применяют для обозначения связанного GalNAc-содержащего соединения, которое представляет собой любое из следующих соединений: GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16. Структура каждого из них представлена в другом месте в данном документе. В первом столбце таблицы 3 представлен AD№ дуплекса, присвоенный дуплексу из смысловой и антисмысловой последовательностей в строке в таблице. Например, дуплекс AD00122 представляет собой дуплекс, состоящий из смысловой нити AD00122-SS и антисмысловой нити AD00122-AS. В каждой строке в таблице 3 представлены смысловая нить и антисмысловая нить и раскрыт дуплекс, образованный указанными смысловой нитью и антисмысловой нитью. "SS№ смысловой нити" во втором столбце таблицы 3 представляет собой назначенный идентификатор смысловой последовательности (включая модификацию), показанной в третьем столбце той же строки. "AS№ антисмысловой нити" в пятом столбце таблицы 3 представляет собой назначенный идентификатор антисмысловой последовательности (включая модификацию), показанной в шестом столбце. Определенные идентификаторы связанных GalNAc-содержащих соединений GLO показаны как GLO-0, и следует понимать, что соединение, обозначенное как GLO-0, может быть заменено на другое из соединений GLO-n или GLS-n, и полученное соединение также включено в варианты осуществления способов и/или композиций по настоящему изобретению.

В таблице 3 представлены последовательности антисмысловой и смысловой нитей химически модифицированного средства для RNAi LPA для теста *in vivo*. Все последовательности показаны в направлении от 5' к 3'. Данные последовательности применяют в некоторых тестовых исследованиях *in vivo*, описанных в другом месте в данном документе. Молекула для доставки, применяемая в исследовании *in vivo*, обозначена как "GLO-0" на 3'-конце каждой смысловой нити. Молекула для доставки, применяемая в исследовании *in vivo*, обозначена как "GLS-5" или "GLS-15" на 5'-конце каждой смысловой нити. Химические модификации обозначены следующим образом: заглавные буквы - 2'-фтор; строчные буквы - 2'-ОМе; фосфоротиоат - *; незамкнутая нуклеиновая кислота - UNA; invab=обратный без основания; imann - если в конце каждой



или при дополнительном связывании с молекулой для доставки:



AD№ дуплекса	SS№ смысловой цепи	Смысловая последовательность	SEQ ID NO	AS№ антисмысловой нити	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO
AD00 149	AD00 149- SS	c*a*gccccuUaUuGuuauacg*a (GLO-0)	424	AD00 149- AS	u*C*guauAacaaUaAg Gggc*u*g	469
AD00 150	AD00 150- SS	a*g*uuaucgAgGcUcauucuc*a (GLO-0)	425	AD00 150- AS	u*G*agaaUgagcCuCg Auaa*c*u	470
AD00 151	AD00 151- SS	u*g*acacaaUgCuCagacgca*a (GLO-0)	426	AD00 151- AS	u*U*gcguCugagCaUu Gugu*c*a	471
AD00 331	AD00 331- SS	g*a*cccaaaUgCuGgcuugau*a (GLO-0)	427	AD00 331- AS	u*A*ucaaGccagCaUu Uggg*u*c	472
AD00 332	AD00 332- SS	g*g*guaaugGaCaGaguuauc*a (GLO-0)	428	AD00 332- AS	u*G*auaaCucugUcCa Uuac*c*c	473
AD00 333	AD00 333- SS	c*u*aauggaCaGaGuuauacg*a (GLO-0)	429	AD00 333- AS	u*U*cgauAacucUgUc Cauu*a*g	474
AD00 334	AD00 334- SS	c*a*guuauacGaGgCacauacu*a (GLO-0)	430	AD00 334- AS	u*A*guauGugccUcGa Uaac*u*g	475
AD00 335	AD00 335- SS	c*u*acugcaAcCuGacacaau*a (GLO-0)	431	AD00 335- AS	u*A*uuguGucagGuU gCagu*a*g	476
AD00 336	AD00 336- SS	c*g*acugcuAcUaCcauuauug*a (GLO-0)	432	AD00 336- AS	u*C*auaaUgguaGuAg Cagu*c*g	477
AD00	AD00	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	433	AD00	u*A*gaugAccaaGcUu	478

337	337- SS	(GLO-0)		337- AS	Ggca*a*c	
AD00 338	AD00 338- SS	c*a*gauucgCcCuUgguguua*a (GLO-0)	434	AD00 338- AS	u*U*aacaCcaagGgCg Aauc*u*g	479
AD00 339	AD00 339- SS	c*g*aaggacAuGuCagucuug*a (GLO-0)	435	AD00 339- AS	u*C*aagaCugacAuGu Ccuu*c*g	480
AD00 340	AD00 340- SS	c*u*ccuuggUgUuAuaccaug*a (GLO-0)	436	AD00 340- AS	u*C*auggUauaaCaCc Aagg*a*g	481
AD00 341	AD00 341- SS	c*c*ccuuggUgUuAuaccaug*a (GLO-0)	437	AD00 341- AS	u*C*auggUauaaCaCc Aagg*g*g	482
AD00 342	AD00 342- SS	g*g*acacaaUgCuCagaaaca*a (GLO-0)	438	AD00 342- AS	u*U*guuuCugagCaUu Gugu*c*c	483
AD00 433	AD00 433- SS	(GLS- 5)*(Invab)*cugauggaCaGaGu uaucgaa*(Invab)	439	AD00 433- AS	u*U*cgauAacucUgUc Cauc*a*g	484
AD00 434	AD00 434- SS	(GLS- 5)*(Invab)*ggcuccuAuUgUu auacgaa*(Invab)	440	AD00 434- AS	u*U*cguaUaacaAuAa Ggag*c*c	485
AD00 435	AD00 435- SS	(GLS- 5)*(Invab)*gaagcaccAaCuGa gcaaaga*(Invab)	441	AD00 435- AS	u*C*uuugCucagUuGg Ugcu*u*c	486
AD00 436	AD00 436- SS	(GLS- 5)*(Invab)*gggaaugGaCaGa guuauca*(Invab)	442	AD00 436- AS	u*G*auaaCucugUcCa Uuuc*c*c	487
AD00 437	AD00 437- SS	(GLS- 5)*(Invab)*gcugcuacUaCcAu uauggaa*(Invab)	443	AD00 437- AS	u*U*ccauAauggUaGu Agca*g*c	488
AD00 438	AD00 438- SS	(GLS- 5)*(Invab)*cauuccagAuGcUg	444	AD00 438- AS	u*G*aucUcagcAuCu Ggau*u*g	489

	SS	agauuca*(Invab)		AS		
AD00 439	AD00 439- SS	(GLS- 5)*(Invab)*gauucuccAcCaCu guuacaa*(Invab)	445	AD00 439- AS	u*U*guaaCagugGuGg Agaau*c	490
AD00 440	AD00 440- SS	(GLS- 5)*(Invab)*gcagaauaCuAcCc aaaugga*(Invab)	446	AD00 440- AS	u*C*cauuUggguAgUa Uucu*g*c	491
AD00 441	AD00 441- SS	(GLS- 5)*(Invab)*ggauucgcCcUuGg uguuaua*(Invab)	447	AD00 441- AS	u*A*uaacAccaaGgGc Gaauc*c	492
AD00 442	AD00 442- SS	(GLS- 5)*(Invab)*cauucgccCuUgGu guuauaa*(Invab)	448	AD00 442- AS	u*U*auaaCaccaAgGg Cgaa*u*g	493
AD00 474	AD00 474- SS	(GLS- 15)*(Invab)*cauggacaGaGuU aucgagga*(Invab)	449	AD00 474- AS	u*C*cuCg(aUNA)uaa cUcUgUcca*u*g	494
AD00 475	AD00 475- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gcugccaaGcUuG gucaucua*(Invab)	450	AD00 475- AS	u*A*gaugAccaaGcUu Ggca*g*c	495
AD00 476	AD00 476- SS	(GLS- 15)*(Invab)*cccaagcuUgGuC aucuaua*(Invab)	451	AD00 476- AS	u*C*auagAugacCaAg Cuug*g*g	496
AD00 477	AD00 477- SS	(GLS- 15)*(Invab)*ggugcuacCaUgG uaauggaa*(Invab)	452	AD00 477- AS	u*U*ccauUaccaUgGu Agca*c*c	497
AD00 478	AD00 478- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gaccauggUaAuG gacagaga*(Invab)	453	AD00 478- AS	u*C*ucUg(uUNA)cca uUaCcAugg*u*c	498
AD00 479	AD00 479- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gugguauGgAcA gaguaua*(Invab)	454	AD00 479- AS	u*A*uaacUcuguCcAu Uacc*a*c	499
AD00 480	AD00 480- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gagaguuaUcGaG gcacauaa*(Invab)	455	AD00 480- AS	u*U*auguGccucGaUa Acuc*u*c	500

AD00 481	AD00 481- SS	(GLS- 15)*(Invab)*caaauggaCaGaG uuaucaaa*(Invab)	456	AD00 481- AS	u*U*ugauAacucUgUc Cauu*u*g	501
AD00 482	AD00 482- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gggacagaGuUaU caaggcaa*(Invab)	457	AD00 482- AS	u*U*gcCu(uUNA)gau aAcUcUguc*c*c	502
AD00 483	AD00 483- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gaucaaguGuCcU ugcaacua*(Invab)	458	AD00 483- AS	u*A*guugCaaggAcAc Uuga*u*c	503
AD00 484	AD00 484- SS	(GLS- 15)*(Invab)*cggguccaGgAuU gcuaccaa*(Invab)	459	AD00 484- AS	u*U*ggUa(gUNA)caa uCcUgGacc*c*g	504
AD00 485	AD00 485- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gugucacaGgAaG gacaugua*(Invab)	460	AD00 485- AS	u*A*caugUccuuCcUg Ugac*a*c	505
AD00 486	AD00 486- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gauguccaGuGaC agaaucaa*(Invab)	461	AD00 486- AS	u*U*gauuCuugucAcUg Gaca*u*c	506
AD00 487	AD00 487- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gcagaggcUcCuU cugaacaa*(Invab)	462	AD00 487- AS	u*U*guucAgaagGaGc Cucu*g*c	507
AD00 474-1	AD00 474-1- SS	(GLS- 15)*(Invab)*cauggacaGaGuU aucgagga*(Invab)	463	AD00 474-1- AS	u*C*cucgAuaacUcUg Ucca*u*g	508
AD00 478-1	AD00 478-1- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gaccauggUaAuG gacagaga*(Invab)	464	AD00 478-1- AS	u*C*ucugUccauUaCc Augg*u*c	509
AD00 482-1	AD00 482-1- SS	(GLS- 15)*(Invab)*gggacagaGuUaU caaggcaa*(Invab)	465	AD00 482-1- AS	u*U*gccuUgauaAcUc Uguc*c*c	510
AD00 484-1	AD00 484-1- SS	(GLS- 15)*(Invab)*cggguccaGgAuU gcuaccaa*(Invab)	466	AD00 484-1- AS	u*U*gguaGcaauCcUg Gacc*c*g	511
AD00	AD00	(GLS-	467	AD00	u*A*gaugAccaaGcUu	512

337-1	337-1-SS	15)*(Invab)*guugccaaGcUuG gucaucua*(Invab)		337-1-AS	Ggca*a*c	
AD00 436-1	AD00 436-1-SS	(GLS- 15)*(Invab)*gggaaugGaCaG aguuaucua*(Invab)	468	AD00 436-1-AS	u*G*auaaCucugUcCa Uuuc*c*c	513
AD00 474-2	AD00 474-2-SS	(GLS- 15)*(Invab)*gauggacaGGuu Aucgagg*u*(Invab)	888	AD00 474-2-AS	a*C*cuCg(aUNA)uaa cUcUgucCa*u*c	892
AD00 480-8	AD00 480-8-SS	(GLS- 15)*(Imann)*gagaguuaUcGa Ggcacaua*a*(Imann)	889	AD00 480-8-AS	u*U*auguGccucGaUa Acuc*u*c	893
AD00 480-1	AD00 480-1-SS	(GLS- 15)*(Invab)*gagaguuaUcGag Gcacaua*a*(Invab)	890	AD00 480-1-AS	u*U*augugccucGaUa acuc*u*c	894
AD00 480-2	AD00 480-2-SS	(GLS- 15)*(Invab)*gagaguuaU*cGa gG*cacaua*a*(Invab)	891	AD00 480-2-AS	u*U*augugccucG*aU *aacuc*u*c	895

Несоответствие

Специалистам в данной области техники известно, что для эффективности dsRNA допустимы несоответствия, особенно когда несоответствия находятся в пределах концевой области dsRNA. Некоторые несоответствия переносятся лучше, например, несоответствия с неоднозначными парами оснований G:U и A:C лучше переносятся с точки зрения эффективности (Du et al., A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 21;33(5):1671-7. Doi: 10.1093/nar/gki312. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(11):3698). В некоторых вариантах осуществления способов и соединений по настоящему изобретению средство на основе dsRNA LPA может содержать одно или несколько несоответствий с целевой последовательностью LPA. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению не содержит несоответствие. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению содержит не более 1 несоответствия. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению содержит не более 2 несоответствий. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению содержит не более 3 несоответствий. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антисмысловая нить средства на основе dsRNA LPA содержит несоответствие целевой последовательности LPA, которое не находится в центре комплементарной области. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить

средства на основе dsRNA LPA содержит 1, 2, 3, 4 или более несоответствий, расположенных в пределах последних 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида одного или обоих из 5'-конца или 3'-конца комплементарной области. Для определения того, эффективны ли средства на основе dsRNA LPA, содержащие несоответствия с целевыми последовательностями LPA, для подавления экспрессии гена LPA, могут быть использованы описанные в данном документе способы и/или способы, известные из уровня техники.

Комплементарность

Используемый в данном документе, если не указано иное, термин "комплементарность/комплементарный" при его использовании для описания корреляции первой нуклеотидной последовательности (например, смысловой нити средства на основе dsRNA LPA или целевой mRNA LPA) со второй нуклеотидной последовательностью (например, антисмысловой нитью средства на основе dsRNA LPA или однонитевым антисмысловым полинуклеотидом) относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность [образовывать водородные связи между парами оснований в физиологических условиях у млекопитающих (или аналогичных условиях *in vitro*)], и образовывать двойную спираль или структуру двойной спирали при определенных условиях. Также могут быть использованы другие условия, такие как физиологически релевантные условия, которые могут возникнуть в организме. Специалист сможет определить наилучший набор условий для тестирования комплементарности двух последовательностей на основе окончательного применения гибридизированных нуклеотидов. Комплементарные последовательности включают пары оснований Уотсона-Крика или пары оснований, отличные от пар Уотсона-Крика, и включают природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов, если это соответствует по меньшей мере условиям, описанным выше для гибридизации. Идентичность или комплементарность последовательностей не зависят от модификаций.

Например, комплементарная последовательность в dsRNA LPA, описанной в данном документе, предусматривает образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или двух нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности в данном документе могут называться "полностью комплементарными" друг другу. Следует понимать, что в вариантах осуществления, в которых два олигонуклеотида предназначены для образования одного или нескольких однонитевых выступающих участков при гибридизации, такие выступающие участки не рассматриваются в данном документе как несоответствия, определяемые на основании комплементарности. Например, средство на основе dsRNA LPA содержит олигонуклеотид длиной 19 нуклеотидов и другой олигонуклеотид длиной 20 нуклеотидов, где более

длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 19 нуклеотидов, полностью комплементарную более короткому олигонуклеотиду, который можно назвать "полностью комплементарным" для описанных в данном документе целей. Таким образом, используемый в данном документе термин "полностью комплементарный" означает, что все (100%) основания в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизироваться с тем же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

Используемый в данном документе термин "в значительной степени комплементарный" означает, что в гибридной паре последовательностей нуклеиновых оснований по меньшей мере приблизительно 85% (но не все) оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида гибридизируются с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Если две последовательности содержат одну или несколько несоответствующих пар оснований во время гибридизации, например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 несоответствующих пар оснований, термин "в значительной степени комплементарный" может использоваться для обозначения первой последовательности, образующей дуплекс длиной до 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований (п. о.) со второй последовательностью, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее подходящих для ее окончательного применения, например, подавления экспрессии гена LPA по пути с участием RISC. Термин "частично комплементарный" может использоваться в данном документе для обозначения того, что в гибридной паре последовательностей нуклеиновых оснований по меньшей мере 75% (но не все) оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида гибридизируются с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления "частично комплементарный" означает, что по меньшей мере 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизироваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный", "в значительной степени комплементарный" и "частично комплементарный" при использовании в данном документе могут использоваться для обозначения соответствия оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью средства на основе dsRNA LPA, соответствия оснований между антисмысловой нитью средства на основе dsRNA LPA и последовательностью целевой mRNA LPA или соответствия оснований между односторонним антисмысловым олигонуклеотидом и последовательностью целевой mRNA LPA. Следует понимать, что термин "антисмысловая нить средства на основе dsRNA LPA" может относиться к той же последовательности, что и "средство на основе

антисмыслового полинуклеотида LPA".

Используемый в данном документе термин "в значительной степени идентичный" или "значительная идентичность", используемый применительно к последовательностям нуклеиновой кислоты, означает, что последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85% или большей идентичностью последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью. Процент идентичности последовательностей определяют путем сравнения результатов наилучшего выравнивания двух последовательностей в окне выравнивания. Проценты рассчитывают путем определения количества положений, в которых одно и то же основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, с получением количества соответствующих положений, деления количества соответствующих положений на общее количество положений в окне выравнивания, и результат умножали на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Изобретения, раскрытые в данном документе, содержат в значительной степени идентичные нуклеотидные последовательности, раскрытые в данном документе (например, в таблицах 1-5). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность полностью идентична или характеризуется по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, в таблицах 1-3).

Используемый в данном документе термин "цепь, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему нуклеотидную цепь, описанную последовательностью, указанной с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "двухнитевая РНК" или "dsRNA" относится к последовательности, содержащей молекулу РНК или комплекс молекул для RNAi, имеющие гибридную двухнитевую область, содержащую две антипараллельные и в значительной степени или полностью комплементарные нити нуклеиновой кислоты, которые называют имеющими "смысловое" и "антисмысловое" направления относительно целевой РНК LPA соответственно. Двухнитевая область может иметь любую требуемую длину, которая обеспечивает специфическое разрушение целевой РНК LPA посредством пути с участием RISC, но обычно ее длина составляет от 9 до 30 пар оснований, например, длина составляет 15-30 пар оснований. Рассматривая дуплекс длиной от 9 до 30 пар оснований, дуплекс может иметь любую длину в пределах данного диапазона, например, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований, и любого его поддиапазона, включая без ограничения 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований, 15-23 пары оснований, 15-22 пары оснований, 15-21 пар оснований, 15-20 пар оснований, 15-19 пар оснований, 15-18 пар оснований, 15-17 пар оснований, 18-

30 пар оснований, 18-26 пар оснований, 18-23 пары оснований, 18-22 пары оснований, 18-21 пару оснований, 18-20 пар оснований, 19-30 пар оснований, 19-26 пар оснований, 19-23 пары оснований, 19-22 пары оснований, 19-21 пару оснований, 19-20 пар оснований, 20-30 пар оснований, 20-26 пар оснований, 20-25 пар оснований, 20-24 пары оснований, 20-23 пары оснований, 20-22 пары оснований, 20-21 пару оснований, 21-30 пар оснований, 21-26 пар оснований, 21-25 пар оснований, 21-24 пары оснований, 21-23 пары оснований или 21-22 пары оснований. Длина средства на основе dsRNA LPA, продуцируемого в клетках при процессировании с помощью Dicer и подобных ферментов, обычно находится в диапазоне 19-22 пары оснований. Одна нить двухнитевой области средства на основе dsDNA LPA содержит последовательность, в значительной степени комплементарную области целевой РНК LPA. Две нити, образующие дуплексную структуру, могут происходить из одной молекулы РНК по меньшей мере с одной самокомплементарной областью или могут быть образованы из двух или более отдельных молекул РНК. В случаях, когда двухнитевая область образована одной молекулой, молекула может иметь дуплексную структуру (называемую в данном документе "шпилечной петлей"), образованную одной нитью одонитевой нуклеотидной цепи на 3'-конце и соответствующей другой нитью на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конфигурация шпильки содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более неспаренных нуклеотидов. Если по сути комплементарные две нити средства на основе dsRNA LPA состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не обязательно должны быть ковалентно связаны, но могут быть ковалентно связаны. Если две нити ковалентно связаны не шпилечной петлей, а с помощью других средств, связывающая структура называется "линкером". Термин "siRNA" также используется в данном документе для обозначения средства на основе dsRNA, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA может содержать смысловые и антисмысловые последовательности, содержащие неспаренные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов на одном или обоих концах средства на основе dsRNA. Концы без неспаренных нуклеотидов называются "тупыми концами" и не имеют выступающих нуклеотидных участков. Если оба конца средств на основе dsRNA представляют собой тупые концы, dsRNA называют молекулами "с тупыми концами". В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первый конец средства на основе dsRNA представляет собой тупой конец, в некоторых вариантах осуществления второй конец средства на основе dsRNA представляет собой тупой конец, и в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения оба конца средства на основе dsRNA LPA представляют собой тупые концы.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению dsRNA не имеет одного или двух тупых концов. В данном случае на конце одной нити средства на основе dsRNA имеется по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. Например, выступающий нуклеотидный участок присутствует, если 3'-конец

одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити, и наоборот. Молекула dsRNA может содержать выступающий участок из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более нуклеотидов. Выступающий нуклеотидный участок может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления выступающий нуклеотидный участок находится на смысловой нити средства на основе dsRNA, на антисмысловой нити средства на основе dsRNA или на обоих концах средства на основе dsRNA, при этом нуклеотид выступающего участка может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах антисмысловой нити или смысловой нити dsRNA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько нуклеотидов в выступающем участке заменены нуклеозидфосфотиоатом.

Используемые в данном документе термины "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относятся к нити средства на основе dsRNA LPA, которая содержит область, в значительной степени комплементарную целевой последовательности LPA. Используемые в данном документе термины "смысловая нить" или "сопровождающая нить" относятся к нити средства на основе dsRNA LPA, которая содержит область, в значительной степени комплементарную области антисмысловой нити средства на основе dsRNA LPA.

Модификация

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК средства для RNAi LPA химически модифицирована с достижением повышенной стабильности и/или одного или нескольких других полезных свойств. Нуклеиновые кислоты в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными из уровня техники, см., например, "Current protocols in Nucleic Acid Chemistry," Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA, которая включена в данный документ посредством ссылки. Модификации, которые могут присутствовать в определенных вариантах осуществления средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, включают, например: (a) концевую модификацию, такую как 5'-концевая модификация (фосфорилирование, конъюгация, обратная связь и т. п.), 3'-концевая модификация (конъюгация, ДНК-нуклеотиды, обратная связь и т. п.); (b) модификацию основания, такую как, в случае пары оснований, замена основания стабилизированным основанием, дестабилизированным основанием или расширенным пулом партнеров, делеция основания (нуклеотид без основания) или конъюгация основания; (c) модификацию сахара (например, в 2'- или 4'-положении) или замену сахара; и (d) модификацию остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирной связи. Конкретные примеры РНК-соединений, доступных в определенных вариантах осуществления средства на основе dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и смысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированный остов или остов без природной межнуклеозидной связи. В качестве

неограничивающего примера можно отметить, что РНК с модификацией остова может не содержать атомов фосфора в остове. РНК, не содержащие атомов фосфора в своем межнуклеозидном остове, могут называться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная РНК содержит атомы фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Следует понимать, что термины "молекула РНК", или "РНК", или "молекула рибонуклеиновой кислоты" включают не только молекулы РНК, экспрессируемые или встречающиеся в природе, но также аналоги и производные РНК, содержащие один или несколько аналогов или производных рибонуклеотидов/рибонуклеозидов, которые описаны в данном документе или известны из уровня техники. Термины "рибонуклеозид" и "рибонуклеотид" используются в данном документе взаимозаменяемо. Молекулы РНК могут быть модифицированы в структурах нуклеиновых оснований или структурах рибозо-фосфатного остова (например, как описано ниже), и молекулы, содержащие аналоги или производные рибонуклеозидов, должны сохранять способность образовывать дуплекс. В качестве неограничивающего примера молекула РНК может также содержать по меньшей мере один модифицированный рибонуклеозид, включая без ограничения 2'-О-метилмодифицированный нуклеозид, нуклеозид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, концевой нуклеозид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, закрытый нуклеозид, нуклеозид без основания, 2'-дезоксид-2'-фтормодифицированный нуклеозид, 2'-аминомодифицированный нуклеозид, 2'-алкилмодифицированный нуклеозид, морфолинонуклеозид, фосфорамидат или нуклеозид, содержащий неприродное основание, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула РНК содержит следующее количество модифицированных рибонуклеозидов: по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или до полной длины рибонуклеозидов молекулы средства на основе dsRNA LPA. Для каждого из множества модифицированных рибонуклеозидов в таких молекулах РНК модификации не обязательно должны быть одинаковыми.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA, антисмысловые полинуклеотиды LPA и/или смысловые полинуклеотиды LPA по настоящему изобретению могут содержать один или несколько независимо выбранных модифицированных нуклеотидов и/или одну или несколько независимо выбранных связей, отличных от фосфодиэфирных. Термин "независимо выбранный", используемый в данном документе, используется для обозначения выбранных элементов, таких как модифицированные нуклеотиды, связи, отличные от фосфодиэфирных, и т. п., для обозначения того, что два или более выбранных элемента могут быть идентичны друг другу, но не обязательно должны быть идентичны друг другу. Используемые в данном документе термины "нуклеотидное основание", "нуклеотид" или "нуклеиновое основание" обозначают гетероциклические пиримидиновые или пуриновые соединения, которые являются стандартными компонентами всех нуклеиновых кислот и включают нуклеотид-

образующие основания: аденин (a), гуанин (g), цитозин (c), тимин (t) и урацил (u). Нуклеиновые основания могут быть дополнительно модифицированы с включением без ограничения универсальных оснований, гидрофобных оснований, неоднозначных оснований, оснований увеличенного размера и фторированных оснований. Термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" может использоваться в данном документе для обозначения немодифицированного нуклеотида, модифицированного нуклеотида или альтернативного фрагмента. Специалисты в данной области техники поймут, что гуанин, цитозин, аденин и урацил можно заменить другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований в олигонуклеотидах, содержащих нуклеотиды, несущие такие заменяющие фрагменты.

В одном варианте осуществления модифицированная РНК, которая, как ожидается, будет применена в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), обладающую способностью образовывать требуемую дуплексную структуру и обеспечивать или опосредовать специфическое разрушение целевой РНК посредством пути с участием RISC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства интерференции на основе РНК LPA содержат однонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК LPA для управления расщеплением целевой РНК LPA.

Модифицированные остовы РНК могут содержать, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокислотфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты (в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты), фосфинат, фосфорамидаты (в том числе 3'-аминофосфорамидаты и аминокислотфосфорамидаты), тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты (которые содержат нормальные 3'-5'-связи, и их 2'-5'-связанные аналоги, а также аналоги с инвертированной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных звеньев связаны в форме 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'). Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. Способы получения фосфорсодержащих связей являются общепринятыми средствами в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенного модифицированного средства на основе dsRNA LPA, определенных модифицированных антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или определенных модифицированных смысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению.

Модифицированный остов РНК, в который не включены атомы фосфора, имеет остов, образованный короткоцепочечной алкильной или циклоалкильной межнуклеозидной связью, смешанным гетероатомом и алкильной или циклоалкильной межнуклеозидной связью или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями, которые включают таковые с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарного фрагмента нуклеозида); силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и

сульфоновые остовы, формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы, алкенсодержащие остовы, сульфаматные остовы, метилениминовые и метиленгидразиновые остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, амидные остовы и другие фрагменты, смешанные с компонентами, представляющими собой N, O, S и CH₂. Способы получения модифицированных остовов РНК, которые не содержат атомы фосфора, являются общепринятой практикой в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенного модифицированного средства на основе dsRNA LPA, определенных модифицированных антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или определенных модифицированных смысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в dsRNA LPA, антисмысловые полинуклеотиды LPA и/или смысловые полинуклеотиды LPA включен миметик РНК, например без ограничения сахара и межнуклеозидные связи (т. е. остовы) нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. В таких вариантах осуществления основные звенья сохранены для гибридизации с подходящими целевыми соединениями нуклеиновой кислоты LPA. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, для которого было показано, что он обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидсодержащим остовом, главным образом аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохраняются и связываются непосредственно или опосредованно с азаатомами азота амидного фрагмента остова. Способы получения миметиков РНК традиционно практикуются в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенного модифицированного средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают РНК, имеющую фосфоротиоатный остов, и олигонуклеозиды, имеющие гетероатомный остов, в частности -CH₂--NH--CH₂-, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[называемый метиленовым (метилямино) или ММІ-остовом], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- и --N(CH₃)--CH₂---[где природный фосфодизфирный остов обозначен как --O--P--O--CH₂--]. Способы получения РНК с фосфоротиоатным остовом и олигонуклеозидов с гетероатомным остовом традиционно практикуются в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенных модифицированных средств на основе dsRNA LPA, определенных антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или определенных смысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению.

Модифицированная РНК также может содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. dsRNA LPA, антисмысловой полинуклеотид LPA и/или смысловой полинуклеотид LPA по настоящему изобретению могут содержать в 2'-положении одно из следующего: OH, F, O--, S-- или N-алкил, O--, S-- или N--алкенил, O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой

замещенный или незамещенный C_1 - C_{10} алкил или C_2 - C_{10} алкенил и алкинил. Иллюстративные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA в положении 2' содержит одно из следующего: C_1 - C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силил, группу расщепления РНК, репортерную группу, интеркалирующее средство, группу, применяемую для улучшения фармакокинетических свойств средства на основе dsRNA LPA или применяемую для улучшения средства на основе dsRNA LPA, группу для улучшения фармакодинамических свойств средства на основе dsRNA LPA, антисмыслового полинуклеотида LPA и/или смыслового полинуклеотида LPA, а также другие заместители со схожими свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификации включают 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), то есть алкокси-алкокси. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламиноэтоксиэтокси, т. е. группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также называемая 2'-DMAOE, как описано в примерах ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH₂-O--CH₂--N(CH₂)₂. Способы получения описанных модифицированных РНК традиционно практикуются в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенных модифицированных средств на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в средствах на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, в других положениях РНК антисмысловых полинуклеотидов LPA, в смысловых полинуклеотидах LPA и/или в других положениях смысловых полинуклеотидов LPA, в частности в 3' положении сахаров на 3'-концевых нуклеотидах или в 2'-5'-связанных dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидах LPA или смысловых полинуклеотидах LPA, а также в 5'-положении 5'-концевых нуклеотидов. Средства на основе dsRNA LPA, антисмысловые полинуклеотиды LPA и/или смысловые полинуклеотиды LPA также могут содержать миметики сахаров, например, вместо циклобутильных фрагментов пентофуранозы. Способы получения, например, описанных модифицированных РНК традиционно практикуются в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенных модифицированных средств на основе dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе dsRNA LPA, антисмысловые полинуклеотиды LPA и/или смысловые полинуклеотиды LPA могут

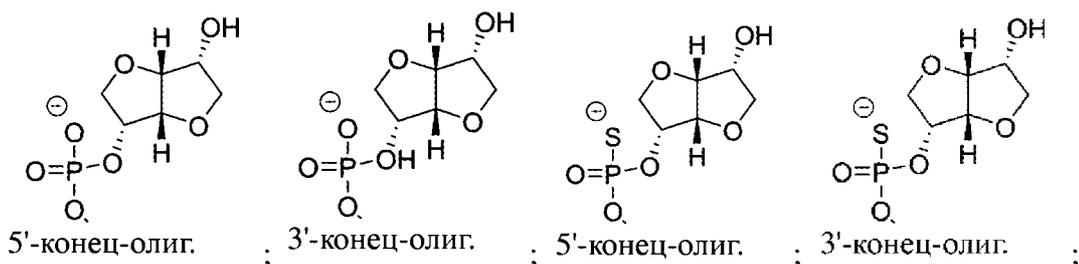
содержать модификации или замены нуклеиновых оснований (обычно называемых в данной области техники просто "основаниями"). Используемые в данном документе термины "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания предусматривают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), а также пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания предусматривают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкилпроизводные аденинов и гуанинов, 2-пропил- и другие алкилпроизводные аденинов и гуанинов, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-азагуанин и 7-азааденин, 3-азагуанин и 3-азааденин. Дополнительные нуклеиновые основания, которые могут быть включены в определенные варианты осуществления средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, известны из уровня техники, см., например: *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. Ed. Wiley-VCH, 2008; *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, страницы 858-859, Kroschwitz, J. L, Ed. John Wiley & Sons, 1990, English et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, Sanghvi, Y S., главу 15, *dsRNA Research and Applications*, страницы 289-302, Crooke, S. T. и Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Способы получения молекул dsRNA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA (таких как описанные в данном документе), содержащих модификации и/или замены нуклеиновых оснований, являются стандартной практикой в данной области техники, и такие способы могут быть использованы для получения определенных модифицированных средств на основе dsRNA LPA, смысловых полинуклеотидов LPA и/или антисмысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению.

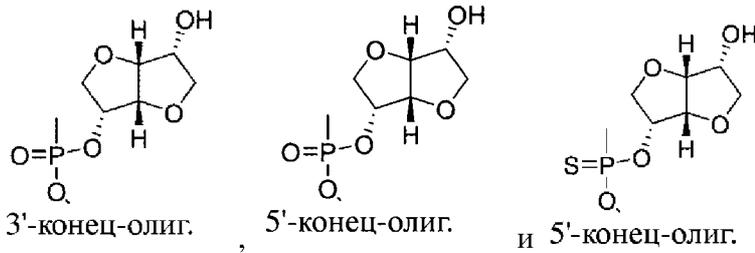
Определенные варианты осуществления средств на основе dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению включают РНК, модифицированную таким образом, что она содержит одну или несколько закрытых нуклеиновых кислот (LNA). Закрытые нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеотиды, содержащие такой модифицированный рибозный фрагмент, который содержит дополнительные мостики, соединяющие 2'- и 4'-атомы углерода. Данная структура эффективно "закрывает" рибозу в 3'-внутренней структурной конформации. Добавление закрытых нуклеиновых кислот к средствам на основе dsRNA LPA, антисмысловым полинуклеотидам LPA и/или смысловым полинуклеотидам LPA по настоящему изобретению может повысить стабильность в сыворотке крови и снизить нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, O R. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843;

Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). В данной области техники широко используются способы получения средств на основе dsRNA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA, содержащих закрытые нуклеиновые кислоты, и такие способы могут быть использованы для получения определенных модифицированных средств на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению. Определенные варианты осуществления соединений на основе dsRNA LPA, смысловых полинуклеотидов и/или антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению включают по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, предусматривающий 2'-О-метилнуклеотид, 2'-фторнуклеотид, 2'-дезоксинуклеотид, миметик 2',3'-секонуклеотида, закрытый нуклеотид, 2'-F-арабинозный нуклеотид, 2'-метоксиэтилнуклеотид, 2'-аминомодифицированный нуклеотид, 2'-алкилмодифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид и 3'-ОМе-нуклеотид, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, или концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-аминомодифицированный нуклеотид, фосфорамидат или нуклеотид, содержащий неприродное основание. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе dsRNA LPA содержит Е-винилфосфонатный нуклеотид на 5'-конце антисмысловой нити (также называемой в данном документе направляющей нитью).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включен в соединение на основе dsRNA LPA на 3'-конце и 5'-конце смыслового полинуклеотида и/или на 3'-конце антисмыслового полинуклеотида, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает нуклеотид без основания, рибит, обратный нуклеотид, обратный нуклеотид без основания, обратный 2'-ОМе-нуклеотид, обратный 2'-дезоксинуклеотид. Специалистам в данной области техники известно, что включение нуклеотидов без основания или обратных нуклеотидов без основания на концах олигонуклеотидов может повысить стабильность (Czuderna et al. *Structural variations and stabilizing modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2705-2716. doi:10.1093/nar/gkg393).

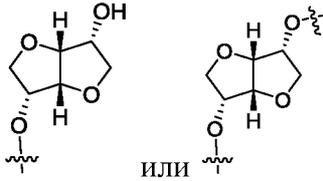
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения dsRNA LPA содержит один или два остатка изоманнита на 3'-конце и 5'-конце смысловой нити. В определенных вариантах осуществления смысловая цепь независимо содержит один остаток изоманнита на 3'-конце или 5'-конце соответственно. Случай, содержащий остаток изоманнита, имеет следующие примеры:



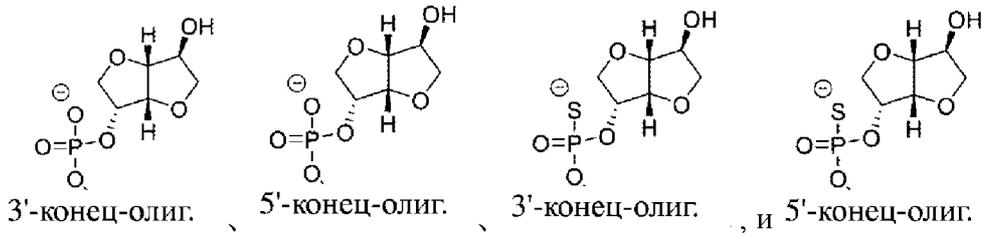


где каждое слово "олиг." независимо обозначает полинуклеотидный фрагмент.

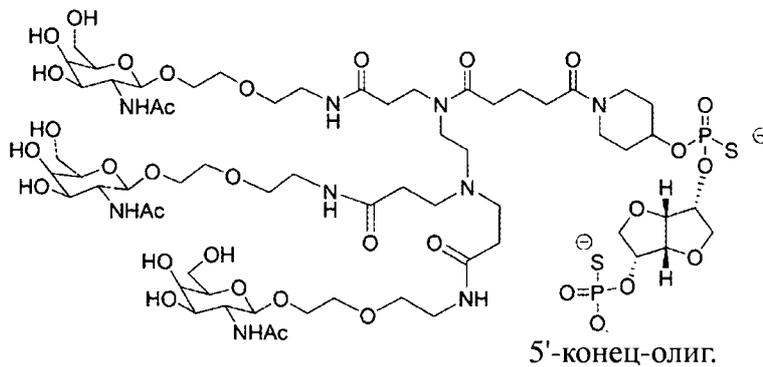
Иллюстративные остатки изоманнита (изоманн.) включают без ограничения следующие:



В некоторых вариантах осуществления остаток изоманнита также может быть заменен его стереоизомером, неограничивающий пример:



В некоторых вариантах осуществления смысловая нить независимо содержит один остаток изоманнита (изоманн.) на 3'-конце или 5'-конце соответственно и дополнительно содержит нацеливающую группу, конъюгированную на 5'-конце, например, нацеливающую группу, представляющую собой N-ацетилгалактозамин, предпочтительно GLS-15, описанный выше, со следующей иллюстративной структурой: .



где каждое слово "олиг." независимо обозначает полинуклеотидный фрагмент.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение и/или антисмысловой полинуклеотид на основе dsRNA LPA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает нуклеотид незамкнутой нуклеиновой кислоты (UNA) и/или

нуклеотид гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA). Специалистам в данной области техники известно, что UNA и GNA являются термолabileными химическими модификациями, которые могут значительно улучшить нецелевой профиль соединений на основе siRNA (Janas, et al., Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. Nat Commun. 2018;9(1):723. doi:10.1038/s41467-018-02989-4; Laursen et al., Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance *in vitro* and *in vivo*. Mol BioSyst. 2010;6:862-70).

В РНК средств на основе dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA из определенных вариантов осуществления настоящего изобретения может быть включена и другая модификация, и она включает один или несколько лигандов, фрагментов или химически связанных конъюгатов с РНК, которые улучшают одну или несколько характеристик средств на основе dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA соответственно. Неограничивающими примерами характеристик, которые могут быть улучшены, являются активность средств на основе dsRNA LPA, антисмысловых полинуклеотидов LPA и/или смысловых полинуклеотидов LPA, клеточное распределение, доставка средств на основе dsRNA LPA, фармакокинетические свойства средств на основе dsRNA LPA и клеточное поглощение средств на основе dsRNA LPA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA содержит одну или несколько нацеливающих или связывающих групп, которые в некоторых вариантах осуществления средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению конъюгированы со смысловой нитью. Неограничивающим примером нацеливающей группы является соединение, содержащее N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Термины "нацеливающая группа", "нацеливающее средство", "связывающее средство", "нацеливающее соединение" и "нацеливающий лиганд" используются в данном документе взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA содержит нацеливающее соединение, конъюгированное с 5'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA содержит нацеливающее соединение, конъюгированное с 3'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA содержит нацеливающую группу, содержащую GalNAc. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA не содержит нацеливающее соединение, конъюгированное с одним или обоими из 3'-конца и 5'-конца смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA не содержит GalNAc-содержащее нацеливающее соединение, конъюгированное с одним или обоими из 5'-конца и 3'-конца смысловой нити.

Кроме того, нацеливающие и связывающие средства хорошо известны из уровня техники, например, нацеливающие и связывающие средства, которые могут быть использованы в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения,

включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестериновые фрагменты (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556), холевую кислоту (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060), сложные тиоэфиры, такие как берил-S-третилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатические цепи, такие как додекандиольные или ундецильные остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54), фосфолипиды, такие как дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицерин-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783), полиаминовые или полиэтиленгликолевые цепи (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654), пальмитоильный фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237) или октадециламиновый или гексаминокарбонилкоксистериновый фрагмент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937).

Определенные варианты осуществления композиций, содержащих средства на основе dsRNA LPA, антисмысловые полинуклеотиды LPA и/или смысловые полинуклеотиды LPA, могут содержать лиганды, которые изменяют распределение, нацеливание и подобные свойства средств на основе dsRNA LPA. В некоторых вариантах осуществления композиций, содержащих средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, лиганды повышают аффинность к выбранным мишеням (таким как молекулы, клетки или типы клеток, компартменты, например, клеточные или органелльные компартменты, ткани, органы или области организма), например, по сравнению с видами, у которых такие лиганды отсутствуют. Лиганды, применимые в композициях и/или способах по настоящему изобретению, могут представлять собой встречающиеся в природе вещества, такие как белки (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулины), углеводы (например, декстран, амилопектин, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липиды. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, такой как синтетическая полиаминокислота или полиамин. Примерами полиаминокислот являются полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновая кислота, поли-L-глутаминовая кислота, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер (L-лактида и гликолевой кислоты), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), полимер N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин,

четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды, включенные в композиции и/или способы по настоящему изобретению, могут содержать нацеливающие группы, неограничиваемыми примерами которых являются средства, нацеливающие на клетки или ткани, такие как лектины, гликопротеины, липиды или белки, такие как антитела, которые связываются со специфическими типами клеток, такими как клетки почек или гепатоциты. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактантный белок А, муциновый углевод, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированную полиаминокислоту, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин В12, витамин А, биотин или RGD-пептид или имитатор RGD-пептидов.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие линкеры (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеил)холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид антеннапедии, пептид Tat), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоактивным изотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридина и имидазола, комплексы тетраазамакроциклов с Eu^{3+}), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды, включенные в композиции и/или способы по настоящему изобретению, могут представлять собой белки, такие как гликопротеины или пептиды, такие как молекулы, обладающие специфической аффинностью к колигандам, или антитела, такие как антитела, которые связываются с конкретными типами клеток, такие как раковые клетки, эндотелиальные клетки, кардиомиоциты или остеоциты. Лиганды, применимые в вариантах осуществления композиций и/или способов по настоящему изобретению, могут представлять собой гормоны или рецепторы гормонов. Лиганды, применимые в вариантах осуществления композиций и/или способов по настоящему изобретению, могут представлять собой липиды, лектины, углеводы, витамины, коферменты, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин,

поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганды, применимые в вариантах осуществления композиций и/или способов по настоящему изобретению, могут представлять собой вещества, которые повышают поглощение средства на основе dsRNA LPA клетками, например, путем разрушения цитоскелета клеток (например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клеток). Неограничивающими примерами таких средств являются таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин и миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганды, связанные со средством на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, применяют в качестве фармакокинетических (ПК) модуляторов. Примеры ПК-модуляторов, которые могут быть использованы в композициях и способах по настоящему изобретению, включают без ограничения липофильные средства, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белковые связывающие вещества, PEG, витамины, холестерин, жирные кислоты, холевые кислоты, литохолевые кислоты, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин, аптамеры, которые связываются с белками сыворотки крови, и т. п. Также известно, что олигонуклеотиды, содержащие множество фосфоротиоатных связей, связываются с белками сыворотки крови и, следовательно, в качестве лигандов в композициях и/или способах по настоящему изобретению также могут быть использованы короткие олигонуклеотиды, содержащие множество фосфоротиоатных связей в остове, такие как олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований.

Композиция, содержащая средство на основе dsRNA LPA

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе dsRNA LPA находятся в композициях. Композиции по настоящему изобретению могут содержать одно или несколько средств на основе dsRNA LPA и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, средств для доставки, нацеливающих средств, выявляемых меток и т. п. Неограничивающие примеры нацеливающих средств, доступных в соответствии с некоторыми вариантами осуществления способа по настоящему изобретению, представляют собой средства, которые направляют средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению к подлежащим обработке клеткам и/или внутрь них. Выбор нацеливающих средств будет зависеть от следующих факторов: природы связанного с LPA заболевания или состояния и типа клетки-мишени. В одном неограничивающем примере в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может быть необходимым нацелить средство на основе dsRNA LPA на гепатоциты и/или в них. Будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению терапевтическое средство содержит средство на основе dsRNA LPA только со средством для доставки, таким как средство для доставки, содержащее N-ацетилгалактозамин (GalNAc), без каких-либо дополнительных связывающих элементов. Например, в некоторых аспектах настоящего изобретения

средство на основе dsRNA LPA может быть связано с соединением для доставки, содержащим GalNAc, и включено в композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, и введено в клетку или организм субъекта без какой-либо выявляемой метки или нацеливающего средства или подобных средств, связанных со средством на основе dsRNA LPA.

В случае, когда средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению вводят вместе и/или оно связано с одним или несколькими средствами для доставки, нацеливающими средствами, средствами для мечения т. п., специалист в данной области техники может понять, выбрать и применять подходящие средства для применения в способе по настоящему изобретению. Средства для мечения могут быть использованы в определенных способах по настоящему изобретению для определения местоположения средства на основе dsRNA LPA в клетках и тканях, а также могут быть использованы для определения местоположения терапевтических композиций, содержащих средства на основе dsRNA LPA, которые были введены в способах по настоящему изобретению в клетки, ткани или органы. Способы прикрепления и применения средств для мечения, таких как ферментные метки, красители, радиоактивные метки и т. п., хорошо известны из уровня техники. Будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению реагент для мечения связан с одним или обоими смысловыми полинуклеотидами и антисмысловыми полинуклеотидами, входящими в состав средства на основе dsRNA LPA.

Доставка средства на основе dsRNA LPA и средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA

Некоторые варианты осуществления способа по настоящему изобретению включают доставку средства на основе dsRNA LPA в клетки. Используемый в данном документе термин "доставка" относится к стимулированию или влиянию на клеточное поглощение или абсорбцию. Абсорбция или поглощение средства на основе dsRNA LPA может происходить посредством независимой диффузии или активного клеточного процесса или с помощью средства для доставки, нацеливающего средства или подобных средств, которые могут быть ассоциированы со средством на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению. Способы доставки, подходящие для способа по настоящему изобретению, включают без ограничения доставку *in vivo*, где средства на основе dsRNA LPA вводят путем инъекции в участки ткани или вводят системно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA связано со средством для доставки.

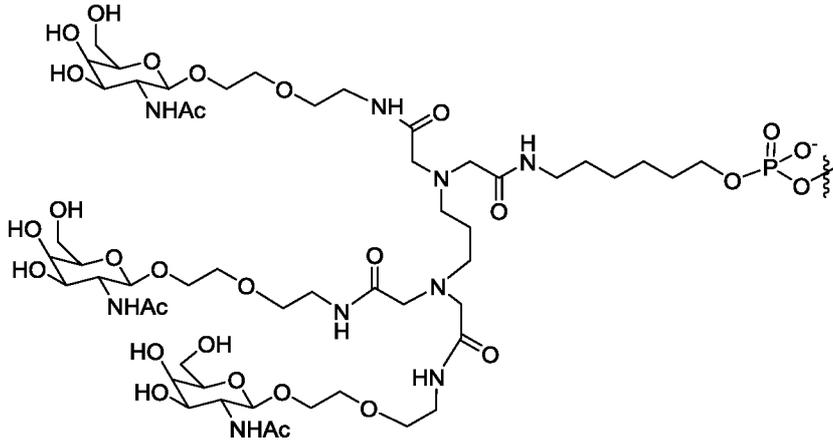
Неограничивающие примеры способов, которые могут быть использованы для доставки средств на основе dsRNA LPA к клеткам, тканям и/или субъектам, включают конъюгаты dsRNA LPA-GalNAc, технологию SAMiRNA, способы доставки на основе LNP и доставку "голой" РНК. Эти и другие способы доставки успешно применяются в данной области техники для доставки терапевтических средств для RNAi для лечения различных заболеваний и состояний, таких как без ограничения заболевания печени, острая

перемежающаяся порфирия (AIP), гемофилия, фиброз легких и т. п. Подробности о нескольких способах доставки можно найти в таких публикациях, как Nikam, R.R. & K. R. Gore (2018) *Nucleic Acid Ther*, 28 (4), 209-224, август 2018 г.; Springer A.D. & S.F. Dowdy (2018) *Nucleic Acid Ther*. 1 июня; 28(3): 109-118; Lee, K. et al., (2018) *Arch Pharm Res*, 41(9), 867-874; и Nair, J.K. et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136:16958-16961, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

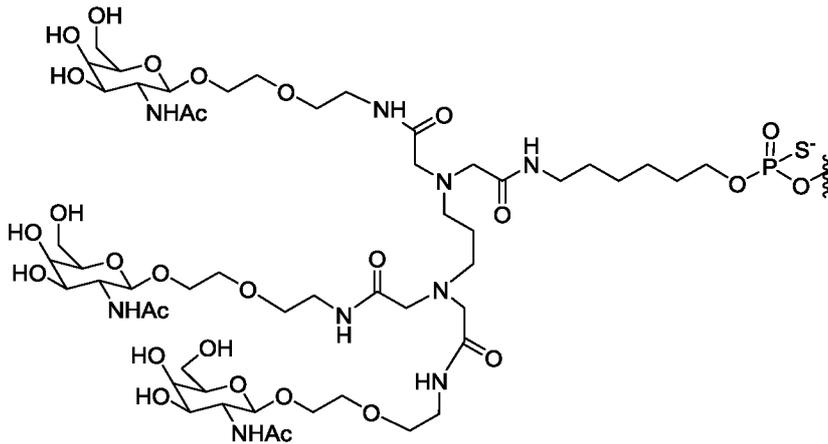
Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение липидных наночастиц (LNP) для доставки средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению к клеткам, тканям и/или субъектам. Молекулы LNP обычно применяют для доставки *in vivo* средств на основе dsRNA LPA, в том числе терапевтических средств на основе dsRNA LPA. Одним из преимуществ применения LNP или других средств для доставки является то, что стабильность средства на основе РНК LPA повышается при доставке субъекту с применением LNP или других средств для доставки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP содержит катионную LNP, загруженную одной или несколькими молекулами для RNAi LPA по настоящему изобретению. LNP, содержащие молекулы для RNAi LPA, вводят субъекту, и LNP и присоединенные к ним молекулы для RNAi LPA поглощаются клетками посредством эндоцитоза. Их присутствие приводит к высвобождению молекул, запускающих RNAi, тем самым опосредуя RNAi.

Другим неограничивающим примером средства для доставки, которое может быть использовано в вариантах осуществления настоящего изобретения для доставки средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению к клеткам, тканям и/или субъектам, является средство, содержащее GalNAc, который связан со средством на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению и доставляет средство на основе dsRNA LPA к клеткам, тканям и/или субъектам. Примеры некоторых других средств для доставки, содержащих GalNAc, которые могут быть использованы в определенных вариантах осуществления способов и композиций по настоящему изобретению, раскрыты в заявке согласно РСТ под номером WO2020191183A1. Неограничивающими примерами GalNAc-содержащих нацеливающих лигандов, которые могут быть использованы в композициях и способах по настоящему изобретению для доставки средства на основе dsRNA LPA в клетки, являются кластеры нацеливающих лигандов. Примерами кластеров нацеливающих лигандов, представленных в данном документе, являются GalNAc-содержащие лиганды с фосфодиэфирными связями (GLO) и GalNAc-содержащие лиганды с фосфоротиоатными связями (GLS). Термин "GLX-n" в данном документе может использоваться для обозначения того, что связанное GalNAc-содержащее соединение представляет собой любое из следующих соединений: GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16, каждое из которых характеризуется структурой, показанной ниже. На представленной ниже фигуре положение связывания GalNAc-

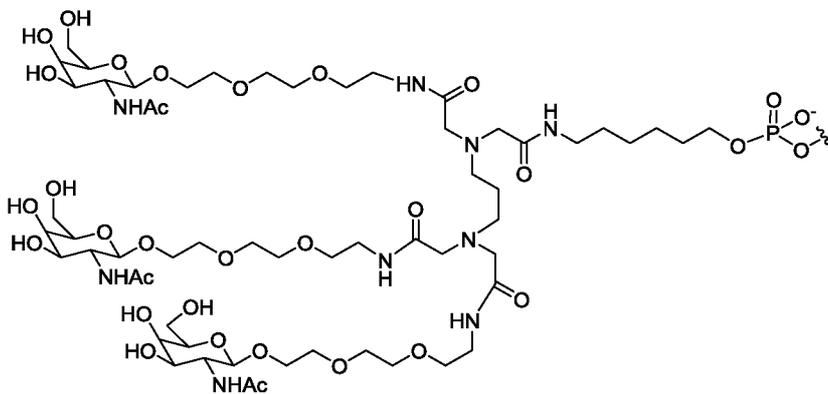
содержащего нацеливающего лиганда со средством для RNAi по настоящему изобретению находится справа от каждого нацеливающего лиганда. Будет понятно, что с GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 и GLO-16 могут быть связаны любые молекулы для RNAi и на основе dsRNA по настоящему изобретению, ниже представлены структуры GLO-1 - GLO-16 и GLS-1 - GLS-16.



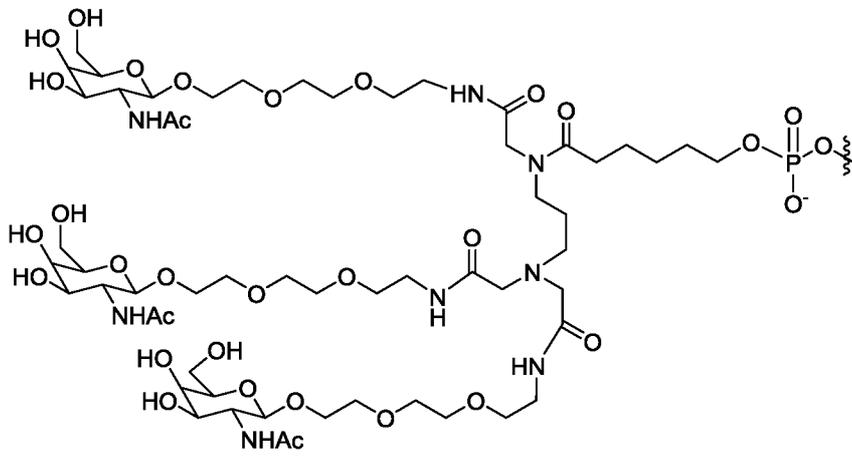
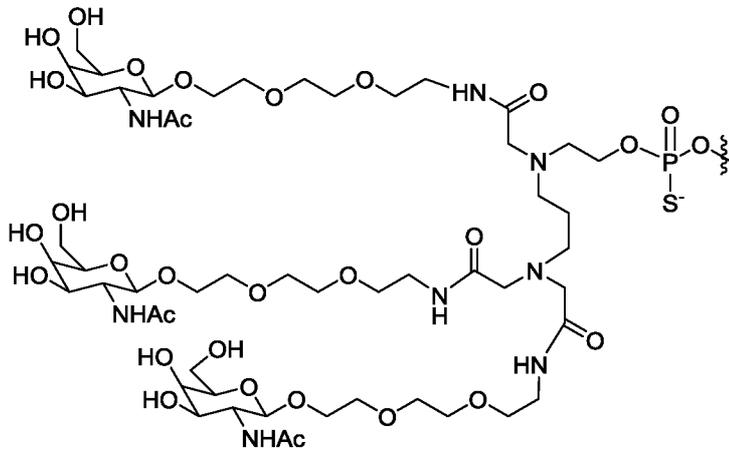
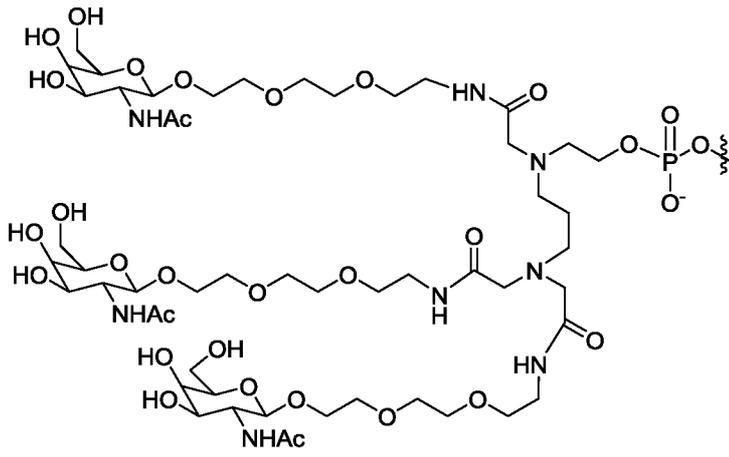
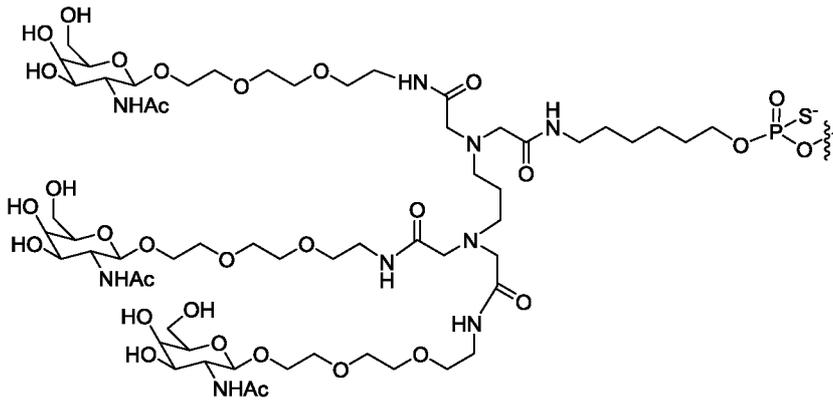
GLO-1,

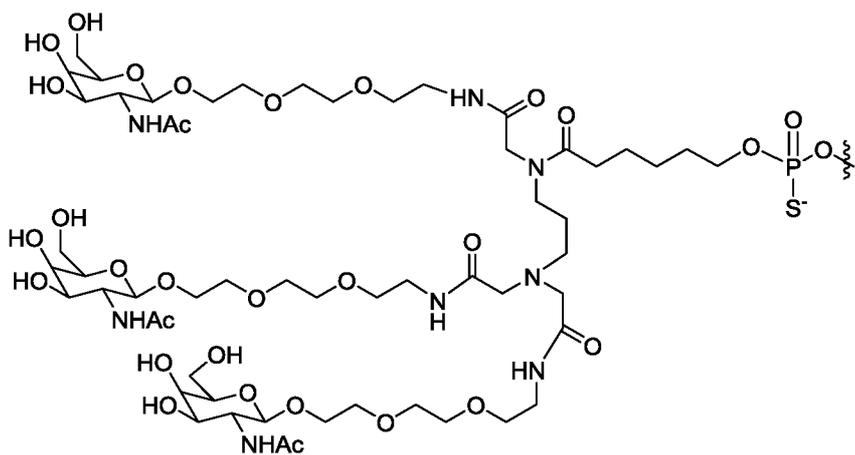


GLS-1,

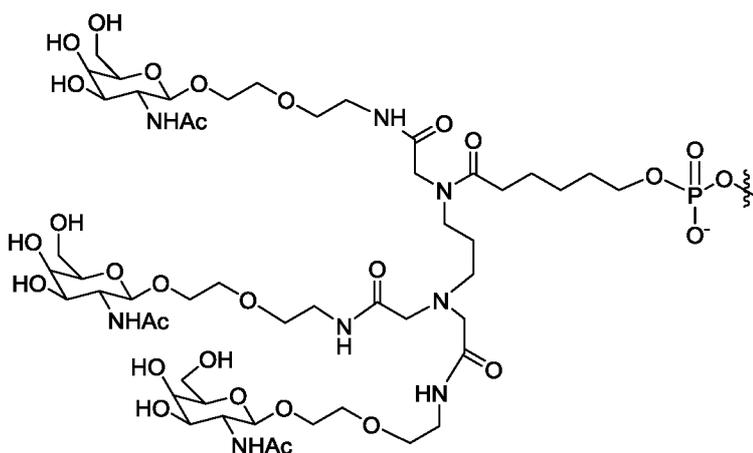


GLO-2,

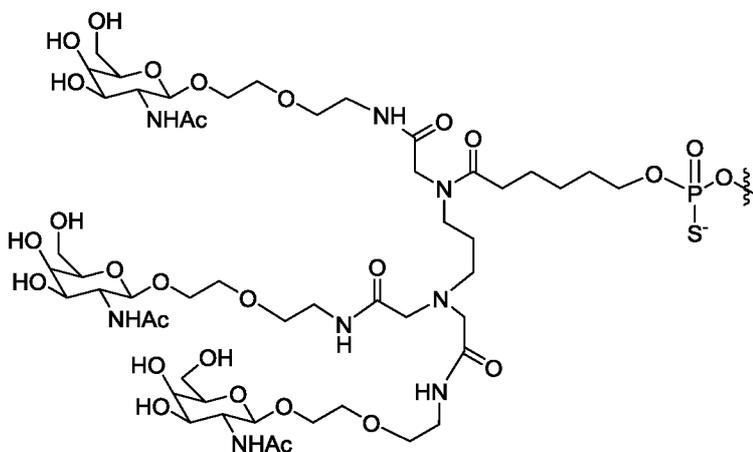




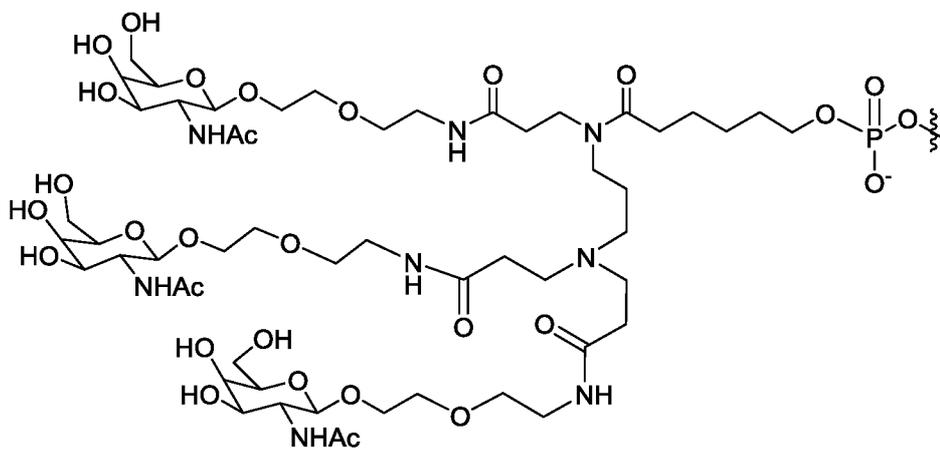
GLS-4,



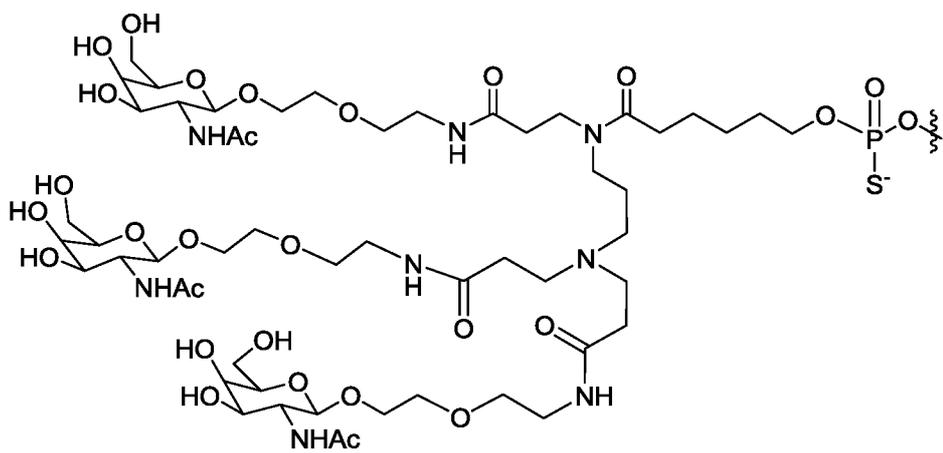
GLO-5,



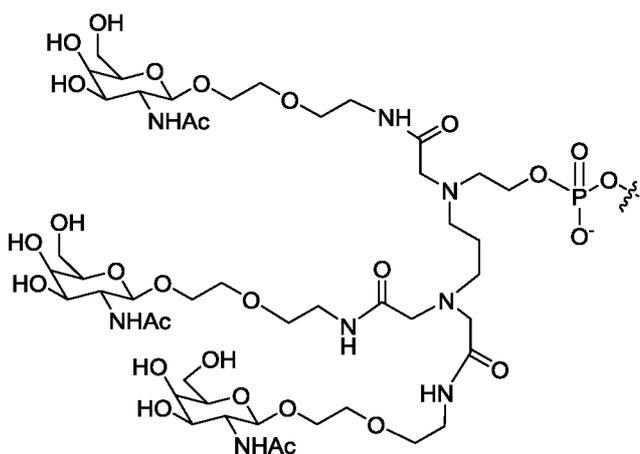
GLS-5,



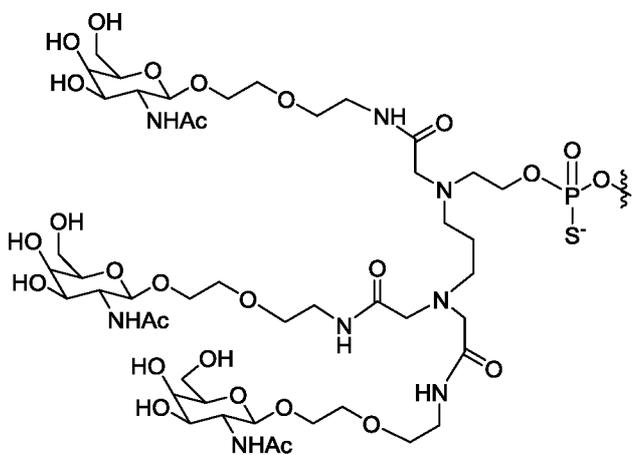
GLO-6,



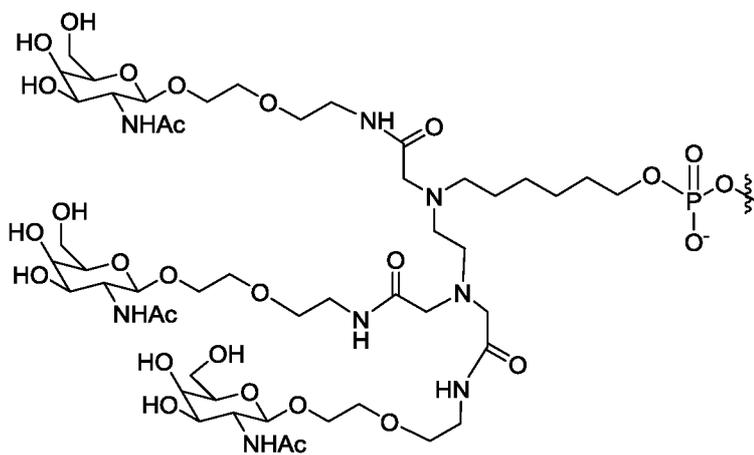
GLS-6,



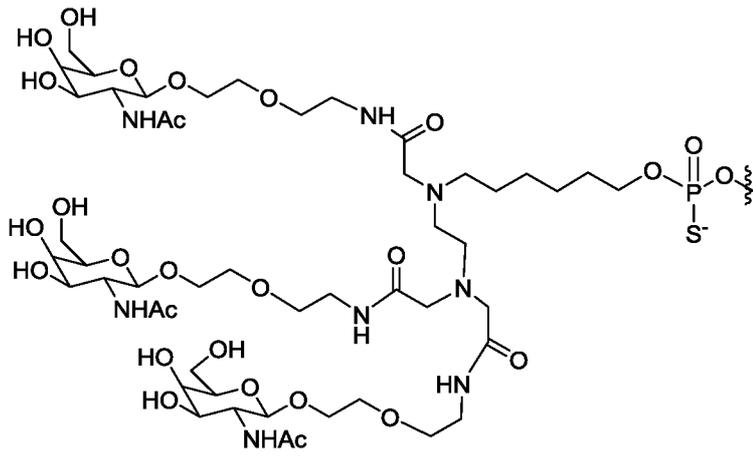
GLO-7,



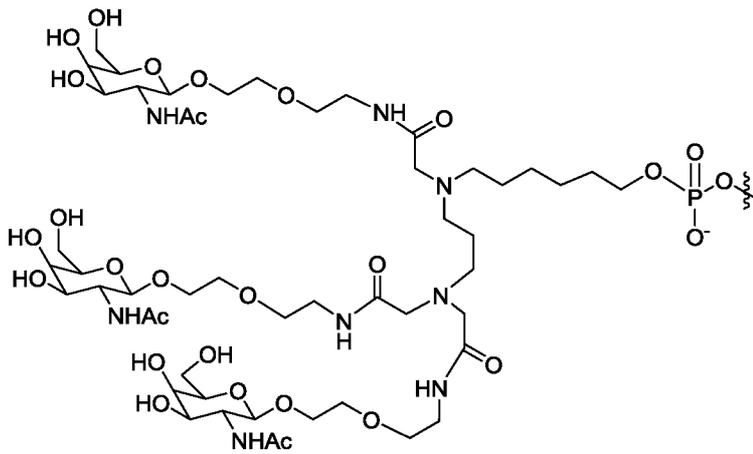
GLS-7,



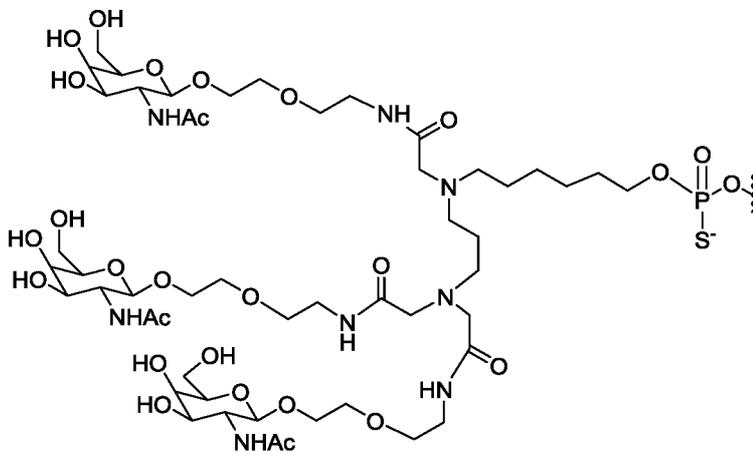
GLO-8,



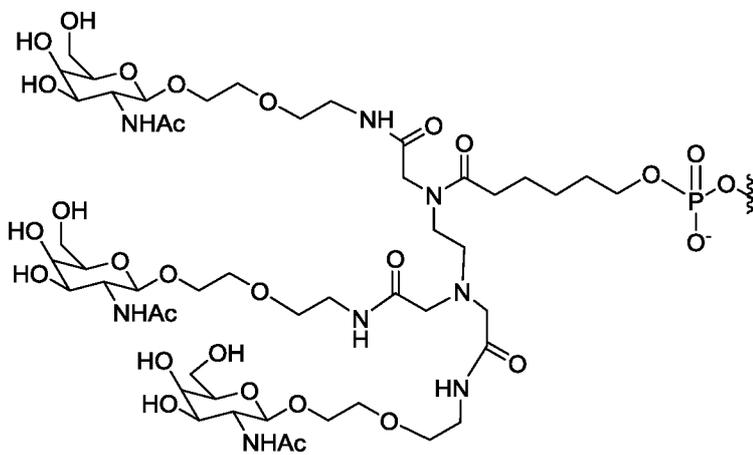
GLS-8,



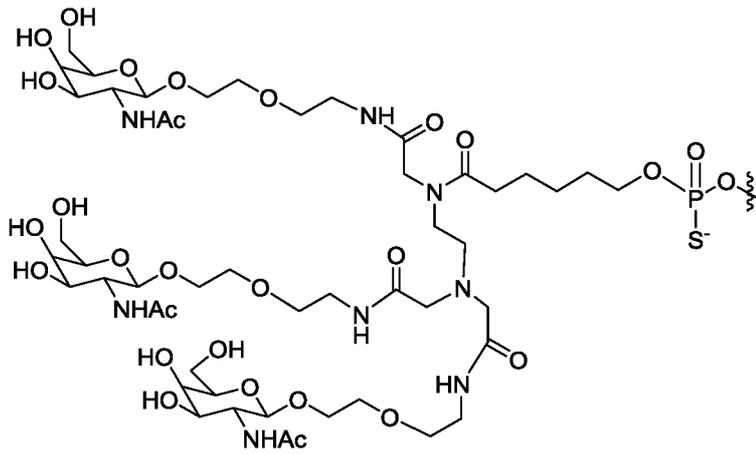
GLO-9,



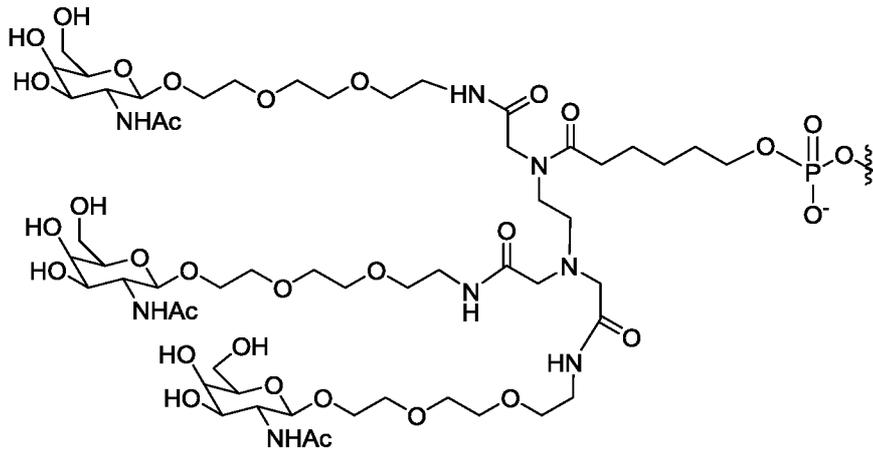
GLS-9,



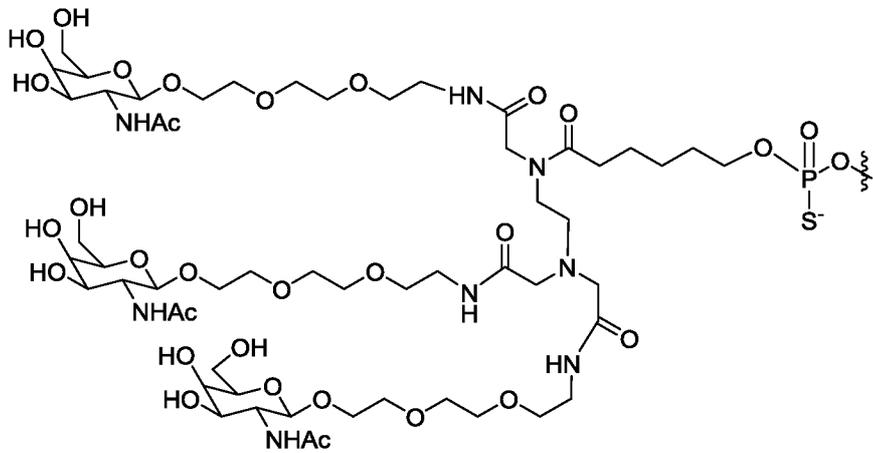
GLO-10,



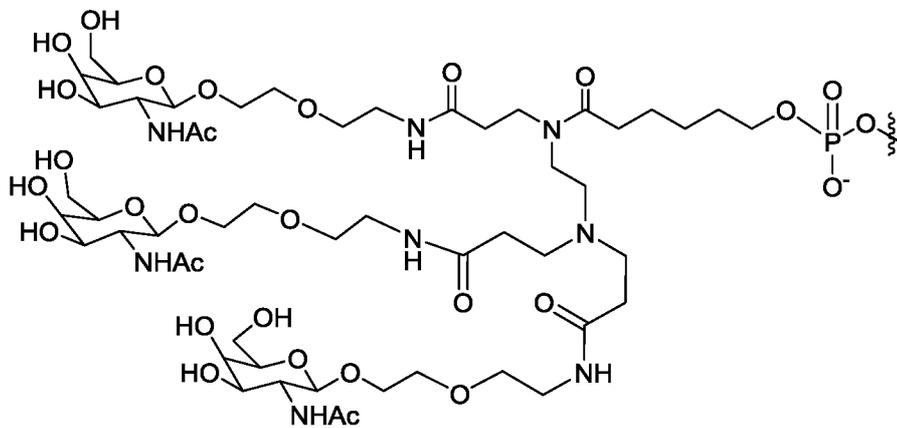
GLS-10,



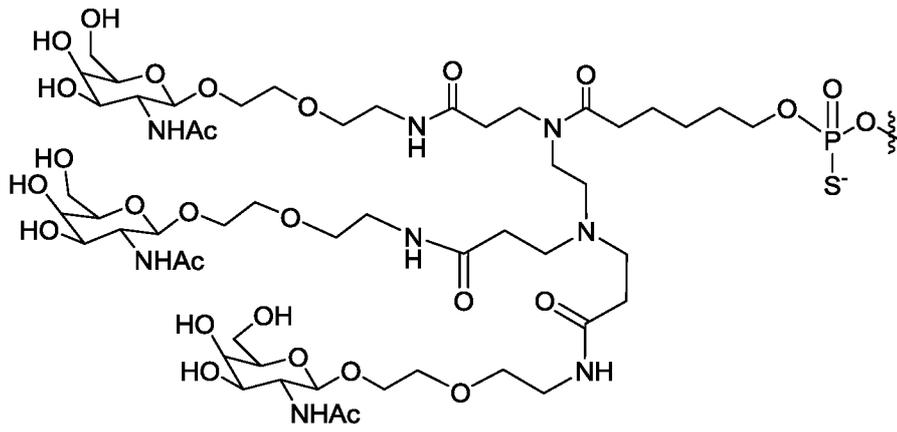
GLO-11,



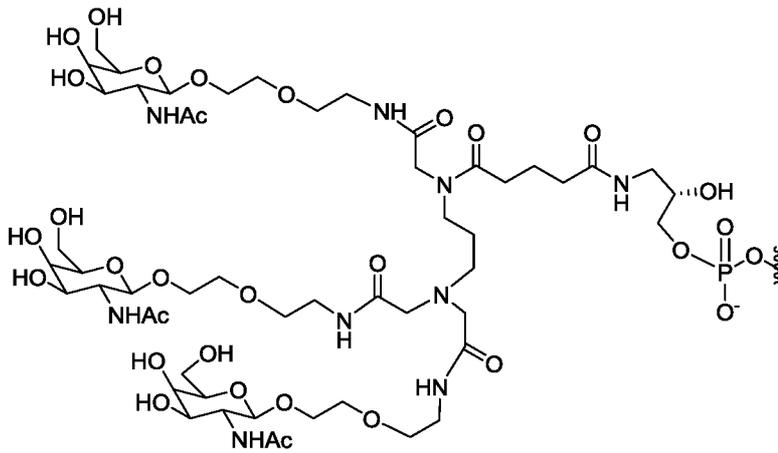
GLS-11,



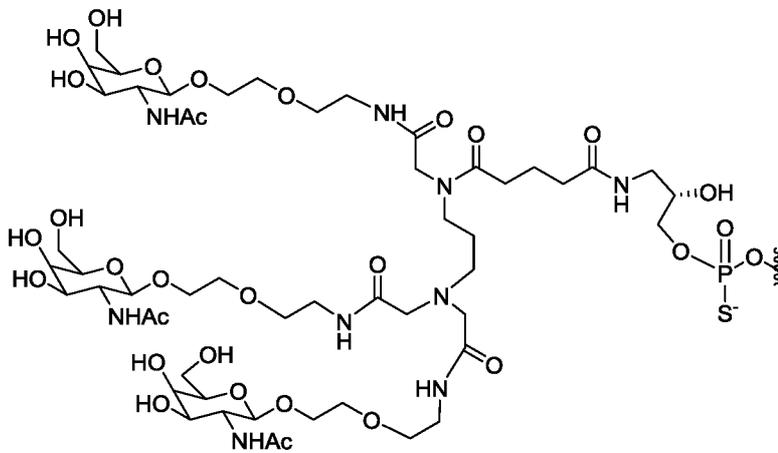
GLO-12,



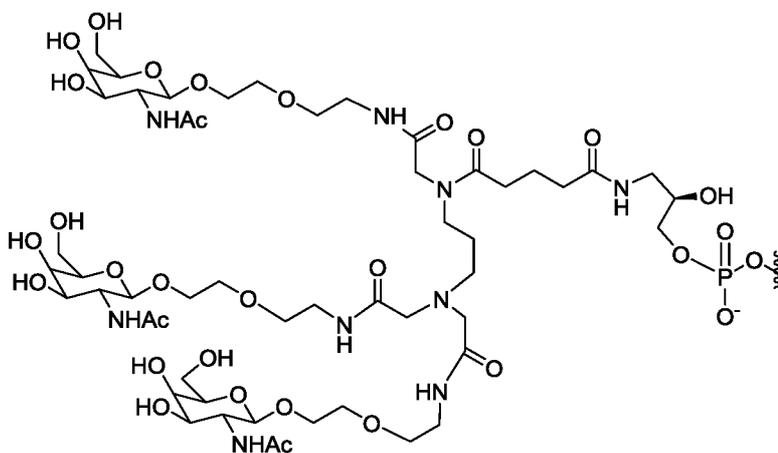
GLS-12,



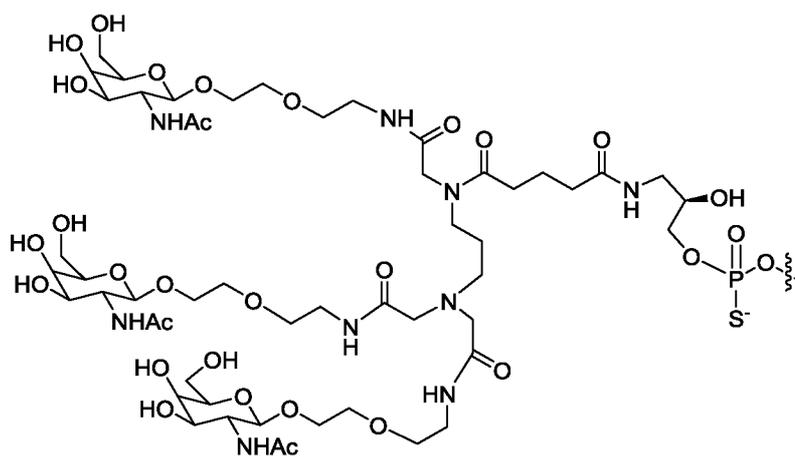
GLO-13,



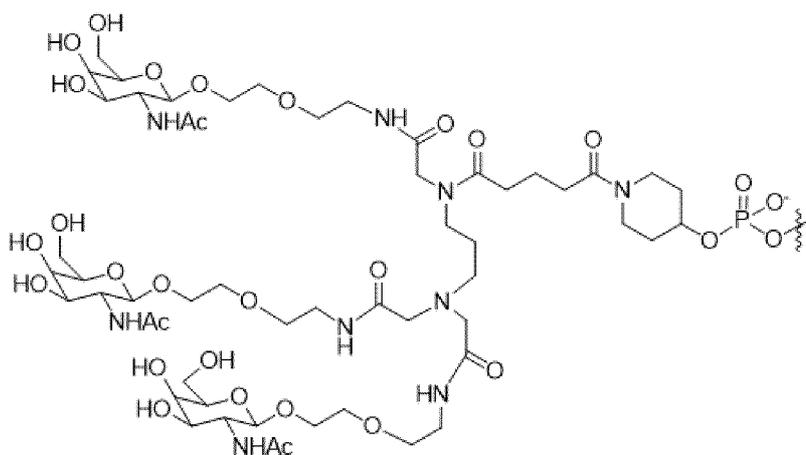
GLS-13,



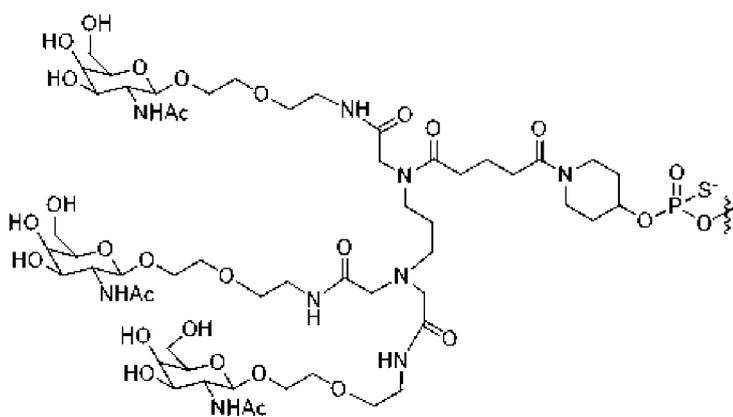
GLO-14,



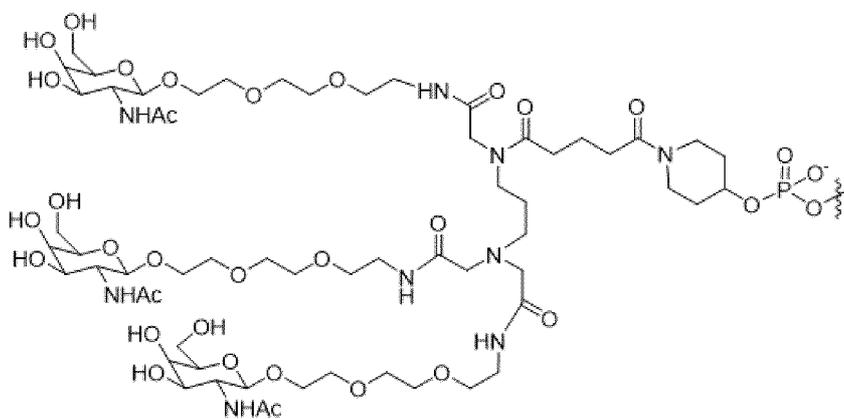
GLS-14,



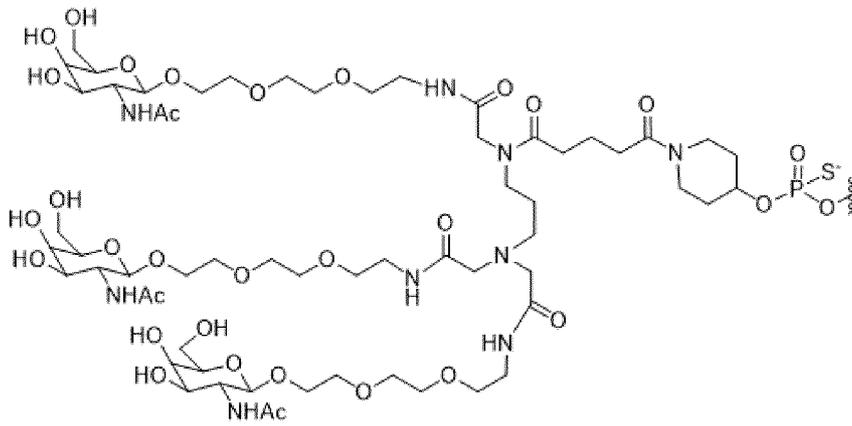
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16,



GLS-16.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доставка *in vivo* также может быть осуществлена с помощью систем доставки на основе бета-декстрана, таких как описанные в патенте США № 5032401 и № 5607677 и публикации патента США № 2005/0281781, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Средства для RNAi LPA также могут быть введены в клетки *in vitro* с применением способов, известных из уровня техники, таких как электропорация и липидная трансфекция. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению dsRNA LPA доставляют без нацеливающего средства. Эти РНК могут быть доставлены в виде "голых" молекул РНК. В качестве неограничивающего примера, dsRNA LPA по настоящему изобретению может быть введена субъекту в фармацевтической композиции, содержащей средство для RNAi, но не нацеливающее средство (например, GalNAc-содержащее нацеливающее соединение), для лечения связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта, такого как сердечно-сосудистое заболевание, где сердечно-сосудистое заболевание предусматривает болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперapoлипопротеинбетапопротеинемиию, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц.

Будет понятно, что в дополнение к определенным способам доставки, описанным в данном документе, могут быть использованы другие способы доставки средств для RNAi в сочетании с вариантами осуществления средств для RNAi LPA и терапевтическими способами, описанными в данном документе, такими как без ограничения описанные в данном документе и применяемые в данной области техники.

Средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению может быть введено

субъекту в количестве и посредством способа, которые эффективно снижают уровень полипептида LPA в клетке и/или в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению одно или несколько средств на основе dsRNA LPA вводят в клетки и/или субъектам для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с экспрессией LPA. В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает введение одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA нуждающемуся в этом субъекту для облегчения заболеваний или состояний, ассоциированных с экспрессией LPA у субъекта. Средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может быть введено для снижения экспрессии LPA в одной или нескольких клетках *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения уровень полипептидов LPA в клетках снижают путем доставки (например, введения) средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA в клетки. Нацеливающие средства и способы могут быть использованы для облегчения доставки средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA к конкретным типам клеток, подтипам клеток, органам, пространственным областям и/или субклеточным областям внутри клеток субъекта. Средство на основе dsRNA LPA может быть введено отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами на основе dsRNA LPA в определенных способах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществлению субъекту вводят 2, 3, 4 или больше независимо выбранных средств на основе dsRNA LPA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе dsRNA LPA вводят субъекту в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапевтическими схемами лечения связанного с LPA заболевания или состояния для лечения связанного с LPA заболевания или состояния. Другими неограничивающими примерами терапевтических схем являются введение одного или нескольких антисмысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению, введение терапевтических средств, отличных от средств на основе dsRNA LPA, и поведенческие модификации. Дополнительные терапевтические схемы могут быть использованы в одном или нескольких из следующих случаев: до введения средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, одновременно с ним и после него. Будет понятно, что "одновременно" в контексте данного документа означает в пределах 5 минут от нулевого момента времени, в пределах 10 минут от нулевого момента времени, в пределах 30 минут от нулевого момента времени, в пределах 45 минут от нулевого момента времени и в пределах 60 минут от нулевого момента времени, где "нулевой момент времени" представляет собой момент времени, в который субъекту вводят средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению. Неограничивающими примерами терапевтических средств, отличных от средств на основе dsRNA LPA, являются дополнительные терапевтические средства, такие как ингибитор HMG-Co-A-редуктазы

(статины), эзетимиб, ингибитор PCSK-9, ингибитор СТЕР, средство терапии, нацеливающееся на ANGPTL3, средство терапии, нацеливающееся на АРОС3, и ниацин или любая их комбинация. Неограничивающими примерами поведенческих модификаций являются схемы питания, консультирование и схемы физических упражнений. Эти и другие терапевтические средства и поведенческие модификации известны из уровня техники и могут применяться для лечения связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта, а также могут быть объединены с одним или несколькими средствами на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению для введения субъекту для лечения связанного с LPA заболевания или состояния. Средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению, вводимое в клетку или субъекту для лечения связанного с LPA заболевания или состояния, может действовать синергически с одним или несколькими другими терапевтическими средствами или активными ингредиентами, тем самым повышая эффективность одного или нескольких терапевтических средств или активных ингредиентов и/или повышая эффективность средства на основе dsRNA LPA при лечении связанного с LPA заболевания или состояния.

Терапевтический способ по настоящему изобретению включает введение средства на основе dsRNA LPA, которое может быть использовано до начала связанного с LPA заболевания или состояния и/или при наличии связанного с LPA заболевания или состояния, в том числе на ранних, средних, поздних стадиях заболевания или состояния и всегда до и после любой из этих стадий. Способ по настоящему изобретению также позволяет лечить субъекта, которого ранее уже лечили одним или несколькими другими терапевтическими средствами и/или терапевтически активными ингредиентами при связанном с LPA заболевании или состоянии, где одно или несколько других терапевтических средств и/или терапевтически активных ингредиентов являются неэффективными, минимально эффективными и/или больше не эффективными в лечении связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта.

Кодируемая вектором dsRNA

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA может быть доставлено в клетки с применением вектора. Транскрипционные единицы средства на основе dsRNA LPA могут содержаться в ДНК- или РНК-векторах. Получение и применение таких векторов, кодирующих трансген, для доставки последовательностей в клетки и/или субъектам хорошо известны из уровня техники. В способе по настоящему изобретению могут быть использованы векторы, приводящие к временной экспрессии dsRNA LPA, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ч или больше, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 недель или больше. Продолжительность временной экспрессии может быть определена с применением традиционных способов, основанных на таких факторах, как без ограничения выбранные конкретные векторные конструкции и клетки-мишени и/или ткани-мишени. Такие трансгены могут быть введены в виде линейных конструкций, циклических плазмид или вирусных векторов, которые могут представлять собой встраиваемые или невстраиваемые векторы. Трансгены также

могут быть сконструированы так, чтобы они наследовались как внехромосомные плазмиды (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 1292).

С промотора в векторе экспрессии может транскрибироваться одна или несколько одиночных нитей средства на основе dsRNA LPA. В случаях, когда должны быть экспрессированы две отдельные нити для получения, например, dsRNA, два отдельных вектора экспрессии могут быть совместно введены в клетку с применением, например, трансфекции или инфицирования. В определенных вариантах осуществления каждая отдельная нить средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению может быть транскрибирована с промотора, содержащегося в том же векторе экспрессии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA экспрессируется в виде полинуклеотида с обратным повтором, связанного линкерной полинуклеотидной последовательностью, так чтобы средство на основе dsRNA LPA характеризовалось структурой "стебель-петля".

Неограничивающими примерами векторов для экспрессии РНК являются ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Векторы экспрессии, применимые в вариантах осуществления настоящего изобретения, могут быть совместимы с эукариотическими клетками. Векторы экспрессии для эукариотических клеток широко применяются в данной области техники и доступны из многих коммерческих источников. Доставка вектора экспрессии dsRNA LPA может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, взятые у субъекта, и последующего повторного введения клеток-мишеней субъекту, или может осуществляться любыми другими способами, которые позволяют ввести требуемые клетки-мишени.

Вирусные векторные системы, которые могут быть включены в варианты осуществления способов, включают без ограничения (a) аденовирусные векторы, (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышиноного лейкоза Молони и т. п., (c) векторы на основе аденоассоциированных вирусов, (d) векторы на основе вируса простого герпеса, (e) векторы на основе SV 40, (f) векторы на основе вируса полиомы, (g) векторы на основе вируса папилломы, (h) пикорнавирусные векторы, (i) векторы на основе вируса оспы, такие как векторы на основе ортопоксвируса, такие как векторы на основе вируса коровьей оспы или векторы на основе авипоксвируса, такие как векторы на основе вируса оспы канареек или вируса оспы птиц, (j) векторы, зависящие от вируса-помощника, или векторы на основе "выпотрошенных" аденовирусов. Конструкции для рекомбинантной экспрессии средств на основе dsRNA LPA могут содержать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры и т. п., которые могут быть выбраны для обеспечения конститутивной или регуляторной/индуцируемой экспрессии. Применение вирусных векторных систем, и промоторов, и энхансеров и т. п. является общепринятым в данной области техники, и они могут быть использованы в сочетании со способами и композициями, описанными в данном документе.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают доставку средств на основе dsRNA LPA в клетки с применением вирусных векторов. Многие системы доставки на основе аденовирусов широко применяются в данной области техники для доставки, например, в легкие, печень, центральную нервную систему, эндотелиальные клетки и мышцы. Неограничивающими примерами вирусных векторов, которые могут быть использованы в способе по настоящему изобретению, являются векторы на основе AAV, вирусы оспы, такие как вирусы коровьей оспы, модифицированные вирусы Анкара (MVA), NYVAC, вирусы оспы птиц, такие как авипоксвирусы или вирусы оспы канареек.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают способы доставки средств на основе dsRNA LPA в клетки с применением векторов, и такие векторы могут находиться в фармацевтически приемлемых носителях, которые могут, но не обязательно, содержать матрицу для замедленного высвобождения, в которую встроен вектор для доставки гена. В некоторых вариантах осуществления вектор для доставки dsRNA LPA может быть получен из рекомбинантных клеток, и фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки dsRNA LPA.

Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе dsRNA или ssRNA LPA

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение фармацевтической композиции, содержащей средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, может быть использована в способе по настоящему изобретению для снижения экспрессии гена LPA в клетках и может быть использована в лечении связанных с LPA заболеваний или состояний. Такая фармацевтическая композиция может быть составлена, исходя из способа доставки. Неограничивающими примерами составов для способов доставки являются композиции, составленные для подкожной доставки, композиции, составленные для системного введения путем парентеральной доставки, композиции, составленные для внутривенной (IV) доставки, композиции, составленные для интратекальной доставки, композиции, составленные для прямой доставки в головной мозг, и т. п. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена с применением одного или нескольких способов для доставки средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA в клетку, и при этом способ осуществляют, например, через поверхность (например, с помощью средства, представляющего собой трансдермальный пластырь), легкое, например, при ингаляции или инсуффляции порошка или аэрозоля, в том числе с помощью небулайзера, внутрь дыхательных путей, интраназально, эпидермально и чрескожно, перорально или парентерально. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную,

подкожную, внутривенную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субэпидермальное, например, с помощью имплантируемого устройства, или интракраниальное, например, внутривенным путем, интратекальное или внутримышечное введение. Средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA также могут быть доставлены непосредственно в ткани-мишени, например, непосредственно в печень, непосредственно в почку и другие ткани. Понятно, что "доставка средства на основе dsRNA LPA" или "доставка средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA" в клетку предусматривает соответственно доставку средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, экспрессию средства на основе dsRNA LPA непосредственно в клетку и экспрессию средства на основе dsRNA LPA с кодирующего вектора, доставленного в клетку, или любой подходящий способ обеспечения появления в клетке средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA. Получение и применение составов и средств для доставки подавляющей РНК хорошо известны и широко используются в данной области техники.

В контексте данного документа "фармацевтическая композиция" содержит фармакологически эффективное количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю, применяемому для введения терапевтического средства. Такой носитель включает без ограничения соляной раствор, забуференный соляной раствор, глюкозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Данный термин явно исключает среды для культивирования клеток. В случае лекарственных средств, вводимых перорально, фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как инертные разбавители, разрыхлители, связующие вещества, смазывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты. Подходящие инертные разбавители включают карбонат натрия и карбонат кальция, фосфат натрия и фосфат кальция, а также лактозу, при этом подходящими разрыхлителями являются кукурузный крахмал и альгинат. Связующие вещества могут включать крахмал и желатин, тогда как смазывающие вещества, если они присутствуют, обычно представляют собой стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. При необходимости таблетка может быть покрыта таким материалом, как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для замедления всасывания в желудочно-кишечном тракте. Реагенты, включенные в фармацевтические составы, дополнительно описаны ниже. Используемые в данном документе термины, такие как "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" и "эффективное количество", относятся к количеству, при котором средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению обеспечивает требуемые фармакологические, терапевтические или профилактические результаты.

Например, если данное клиническое лечение считается эффективным, когда измеряемый параметр, ассоциированный с заболеванием или нарушением, снижается на по меньшей мере 10%, то терапевтически эффективным количеством лекарственного средства для лечения заболевания или состояния является количество, необходимое для снижения параметра на по меньшей мере 10%. Например, терапевтически эффективные количества средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA могут снижать уровни полипептида LPA на по меньшей мере 10%. Фармацевтическая композиция может содержать такое средство для dsRNAi, содержащее, например, дуплекс, показанный в таблице 1. В некоторых других вариантах осуществление такое средство для dsRNAi содержит вариант дуплекса, представленного в таблице 1.

Эффективное количество

В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению включает приведение клеток в контакт с эффективным количеством средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для снижения экспрессии гена LPA в приведенных в контакт клетках. Некоторые варианты осуществления способа по настоящему изобретению предусматривают введение средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA субъекту в количестве, которое эффективно снижает экспрессию гена LPA и обеспечивает лечение связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта. В целях снижения экспрессии LPA и/или для лечения связанных с LPA заболеваний или состояний применяемое "эффективное количество" представляет собой количество, необходимое или достаточное для достижения требуемого биологического эффекта. Например, эффективное количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для лечения связанного с LPA заболевания или состояния может (i) представлять собой количество, необходимое для замедления или остановки прогрессирования заболевания или состояния, (ii) обращать вспять, снижать или устранять один или несколько симптомов заболевания или состояния. В некоторых аспектах настоящего изобретения эффективным количеством является количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, которое при введении субъекту, нуждающемуся в лечении связанного с LPA заболевания или состояния, приводит к терапевтическому ответу в виде предупреждения и/или лечения заболевания или состояния. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения эффективное количество представляет собой количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению, которое при комбинированном или совместном введении с другим терапевтическим средством лечения связанного с LPA заболевания или состояния приводит к терапевтическому ответу в виде предупреждения и/или лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологический эффект лечения субъекта средством на основе dsRNA LPA или средством на основе антисмыслового

полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может заключаться в улучшении и/или полном устранении симптомов, вызываемых связанным с LPA заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологический эффект заключается в полном устранении связанного с LPA заболевания или состояния, о чем свидетельствует, например, результат диагностического теста, указывающий на то, что у субъекта отсутствует связанное с LPA заболевание или состояние. Неограничивающие примеры выявляемых физиологических симптомов включают снижение накопления липидов в печени субъекта после введения средства по настоящему изобретению. Для определения влияния средств и/или способов по настоящему изобретению на связанное с LPA заболевание или состояние могут быть использованы и другие известные из уровня техники способы оценивания статуса связанного с LPA заболевания или состояния.

Эффективные количества средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, которые снижают количество полипептидов LPA до уровней, необходимых для лечения связанных с LPA заболеваний или состояний, обычно определяют в клинических испытаниях, которые позволяют установить эффективные дозы для тестируемой популяции и контрольной популяции в слепых исследованиях. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, которое приводит к требуемому ответу, например, количество, которое снижает степень проявления связанного с LPA заболевания или состояния в клетках, тканях и/или у субъектов с таким заболеванием или состоянием. Таким образом, эффективное количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для лечения связанного с LPA заболевания или состояния, которое можно лечить путем снижения количества полипептида LPA, может представлять собой количество, которое при введении снижает количество полипептида LPA у субъекта до меньшего количества, чем то, которое присутствовало бы в клетках, тканях и/или у субъекта без введения средства на основе LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA. В некоторых аспектах настоящего изобретения уровни экспрессии полипептида LPA и/или гена LPA, присутствующие в клетках, тканях и/или у субъектов, которые не приводились в контакт со средством на основе dsRNA LPA или средством на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению или которым оно не было введено, называются "контрольными" величинами. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению контрольной величиной для субъекта является величина для субъекта до лечения; другими словами, уровень для субъекта до введения средства LPA может представлять собой контрольный уровень для субъекта и может применяться для сравнения с уровнем экспрессии полипептида LPA и/или гена LPA после введения siRNA субъекту. В случае лечения связанного с LPA заболевания или состояния требуемый ответ может представлять собой снижение или устранение одного или нескольких симптомов заболевания или состояния в клетках, тканях и/или у субъекта. Снижение или устранение

может быть временным или постоянным. Будет понятно, что статус связанных с LPA заболеваний или состояний может быть подвергнут мониторингу с применением таких способов, как определение полипептидов LPA и экспрессии гена LPA, оценка симптомов, клинический тест и т. п. В некоторых аспектах настоящего изобретения требуемым ответом на лечение связанного с LPA заболевания или состояния является задержка начала заболевания или состояния или даже предупреждение начала заболевания или состояния.

Эффективное количество соединения, которое снижает уровень полипептида LPA, также может быть определено путем оценивания физиологического эффекта введения средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA на клетку или субъекта, такого как снижение степени проявления связанных с LPA заболеваний или состояний после введения. Анализ и/или мониторинг симптомов у субъекта могут быть использованы для определения эффективности средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению, которые могут быть введены в фармацевтическом соединении по настоящему изобретению, и для определения того, имеет ли место ответ на лечение. Одним неограничивающим примером является один или несколько известных из уровня техники тестов для определения липидного профиля сыворотки крови. Другим неограничивающим примером является то, что для определения статуса связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта до и после лечения субъекта средством на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению могут быть использованы один или несколько известных из уровня техники функциональных тестов печени. В другом неограничивающем примере для определения статуса связанного с LPA заболевания у субъекта применяют один или несколько известных из уровня техники тестов для определения накопления холестерина в печени. В данном варианте осуществления заболевание включает накопление холестерина, и тест применяют для определения уровней холестерина у субъекта до и после лечения субъекта средством на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают способ определения эффективности средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению, вводимого субъекту для лечения связанного с LPA заболевания или состояния, путем оценивания и/или мониторинга одной или нескольких "физиологических характеристик" связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта. Неограничивающими примерами физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния являются уровень LPA в сыворотке крови субъекта, уровень липидов в сыворотке крови субъекта, уровень липопротеинов низкой плотности у субъекта, уровень HDL у субъекта, соотношение LDL: HDL у субъекта, уровень триглицеридов у субъекта, жир, присутствующий в печени субъекта, физические симптомы и т. п. Стандартные способы определения таких физиологических характеристик известны из уровня техники и включают без ограничения

анализы крови, визуализирующие исследования, физикальные осмотры и т. п.

Будет понятно, что количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, вводимого субъекту, может быть модифицировано на основании, по меньшей мере частично, результатов определения статуса заболевания и/или состояния и/или физиологических характеристик субъекта. Терапевтическое количество может быть изменено, например, путем увеличения или уменьшения количества средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, путем изменения композиции, в которой вводят средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, путем изменения пути введения, путем изменения времени введения или т. п. Эффективное количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA будет варьироваться в зависимости от конкретного подвергаемого лечению состояния, возраста и физического состояния подвергаемого лечению субъекта, степени тяжести состояния, продолжительности лечения, характера совместного лечения (если таковое имеет место), конкретного пути введения и других факторов, находящихся в пределах знаний и опыта практикующего врача. Например, эффективное количество может зависеть от уровня полипептида LPA и/или требуемого уровня экспрессии гена LPA, который эффективен для лечения связанных с LPA заболеваний или состояний. Специалист в данной области техники сможет эмпирически определить эффективное количество конкретного средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для применения в способе по настоящему изобретению без чрезмерных экспериментов. В сочетании с идеями, представленными в данном документе, может быть спланирована эффективная профилактическая или терапевтическая схема для эффективного лечения конкретного субъекта путем выбора из множества средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению и взвешивания таких факторов, как эффективность, относительная биодоступность, вес пациента, степень тяжести побочных эффектов и предпочтительный режим введения. Используемое в вариантах осуществления настоящего изобретения эффективное количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может представлять собой количество, которое приводит к достижению требуемого биологического эффекта в отношении клеток при контакте с клетками.

Следует признать, что сайленсинг гена LPA может быть осуществлен конститутивно или путем геномной инженерии в любой клетке, экспрессирующей LPA, и может быть определен посредством любого подходящего анализа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия гена LPA снижается на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% при введении средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения экспрессия гена LPA снижается на 5-10%, 5-25%, 10-50%, 10-75%, 25-75%, 25-100% или 50-100% при введении средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению.

Режим

Средство на основе dsRNA LPA и средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA доставляют в фармацевтической композиции в дозе, достаточной для подавления экспрессии гена LPA. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения доза средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA составляет от 0,01 до 200,0 мг на кг веса тела субъекта в сутки, обычно от 1 до 50 мг/кг веса тела, от 5 до 40 мг/кг веса тела, от 10 до 30 мг/кг веса тела, от 1 до 20 мг/кг веса тела, от 1 до 10 мг/кг веса тела, от 4 до 15 мг/кг веса тела в сутки, включая конечные значения. Например, средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть введено в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг, 2,6 мг/кг, 2,7 мг/кг, 2,8 мг/кг, 2,9 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,1 мг/кг, 3,2 мг/кг, 3,3 мг/кг, 3,4 мг/кг, 3,5 мг/кг, 3,6 мг/кг, 3,7 мг/кг, 3,8 мг/кг, 3,9 мг/кг, 4 мг/кг, 4,1 мг/кг, 4,2 мг/кг, 4,3 мг/кг, 4,4 мг/кг, 4,5 мг/кг, 4,6 мг/кг, 4,7 мг/кг, 4,8 мг/кг, 4,9 мг/кг, 5 мг/кг, 5,1 мг/кг, 5,2 мг/кг, 5,3 мг/кг, 5,4 мг/кг, 5,5 мг/кг, 5,6 мг/кг, 5,7 мг/кг, 5,8 мг/кг, 5,9 мг/кг, 6 мг/кг, 6,1 мг/кг, 6,2 мг/кг, 6,3 мг/кг, 6,4 мг/кг, 6,5 мг/кг, 6,6 мг/кг, 6,7 мг/кг, 6,8 мг/кг, 6,9 мг/кг, 7 мг/кг, 7,1 мг/кг, 7,2 мг/кг, 7,3 мг/кг, 7,4 мг/кг, 7,5 мг/кг, 7,6 мг/кг, 7,7 мг/кг, 7,8 мг/кг, 7,9 мг/кг, 8 мг/кг, 8,1 мг/кг, 8,2 мг/кг, 8,3 мг/кг, 8,4 мг/кг, 8,5 мг/кг, 8,6 мг/кг, 8,7 мг/кг, 8,8 мг/кг, 8,9 мг/кг, 9 мг/кг, 9,1 мг/кг, 9,2 мг/кг, 9,3 мг/кг, 9,4 мг/кг, 9,5 мг/кг, 9,6 мг/кг, 9,7 мг/кг, 9,8 мг/кг, 9,9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, 21 мг/кг, 22 мг/кг, 23 мг/кг, 24 мг/кг, 25 мг/кг, 26 мг/кг, 27 мг/кг, 28 мг/кг, 29 мг/кг, 30 мг/кг, 31 мг/кг, 32 мг/кг, 33 мг/кг, 34 мг/кг, 35 мг/кг, 36 мг/кг, 37 мг/кг, 38 мг/кг, 39 мг/кг, 40 мг/кг, 41 мг/кг, 42 мг/кг, 43 мг/кг, 44 мг/кг, 45 мг/кг, 46 мг/кг, 47 мг/кг, 48 мг/кг, 49 мг/кг до 50 мг/кг веса тела.

При определении дозы и времени доставки средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению может быть учтено множество факторов. Абсолютное количество доставляемых средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA будет зависеть от множества факторов, в том числе совместного лечения, количества доз и индивидуальных параметров субъекта, включая возраст, физическое состояние, физический размер и вес тела. Эти факторы хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть определены посредством обычных экспериментов. В некоторых вариантах осуществления может быть использована максимальная доза, то есть наиболее высокая безопасная доза, основанная на разумном медицинском заключении.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению может

включать введение субъекту 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA. В некоторых случаях фармацевтическое соединение (например, содержащее средство на основе dsRNA LPA или содержащее средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA) может быть введено субъекту в определенной дозе по меньшей мере один раз в сутки, один раз в двое суток, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц и т. д. и может быть введено один раз в сутки или более одного раза в сутки, например, 2, 3, 4, 5 или больше раз в 24-часовом цикле. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена один раз в сутки, либо средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть введено в двух, трех или более субдозах с подходящими интервалами в течение суток или даже может быть доставлено с применением непрерывных инфузий или составов с контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят субъекту один или несколько раз в сутки, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц или один или несколько раз в год.

В определенных аспектах способ по настоящему изобретению включает введение фармацевтического соединения отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими средствами на основе dsRNA LPA или средствами на основе антисмыслового полинуклеотида LPA и/или в комбинации с другими лекарственными средствами терапии или терапевтическими действиями или протоколами, назначаемыми субъекту со связанным с LPA заболеванием или состоянием. Фармацевтическое соединение может быть введено в форме фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция, применяемая в способе по настоящему изобретению, может быть стерильной и содержать такое количество средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, которое снижает уровень полипептида LPA до уровня, достаточного для получения требуемого ответа в единице веса или объема, подходящего для введения субъекту. Подлежащая введению субъекту доза фармацевтической композиции, содержащей средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, может быть выбрана в соответствии с различными параметрами для снижения уровня белка LPA, в частности, в соответствии с применяемым режимом введения и статусом субъекта. Другие факторы включают продолжительность необходимого лечения. Если ответ субъекта на начальную дозу не является достаточным, может быть использована более высокая доза в пределах переносимости пациента (или доза может быть эффективно увеличена посредством другого, более локализованного пути доставки).

Лечение

Используемые в данном документе термины "предупредить" или "предупреждение" при их использовании по отношению к заболеванию, состоянию или нарушению, при котором было бы полезно снижение экспрессии гена LPA, относятся к

снижению вероятности того, что у субъекта возникнет симптом, связанный с заболеванием, состоянием или нарушением, таким как сердечно-сосудистое заболевание, включая болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперполипротеинбетаполипротеинемия, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц. В таких случаях вероятность возникновения такого заболевания снижается, например, когда у индивидуума имеются один или несколько факторов риска развития сердечно-сосудистого заболевания, но у него не развивается сердечно-сосудистое заболевание или развивается лишь сердечно-сосудистое заболевание меньшей степени тяжести, эффективным предупреждением считается, если у индивидуума не развивается связанное заболевание, состояние или состояние, или он характеризуется сниженной степенью развития симптомов, ассоциированных с таким заболеванием, состоянием или состоянием (например, снижением клинического масштаба заболевания или состояния на по меньшей мере приблизительно 10%), или отсроченным проявлением симптомов (например, отсрочка на несколько дней, недель, месяцев или лет) по сравнению с популяцией с теми же факторами риска и без получения описанного в данном документе лечения.

В случае связанного с LPA заболевания и состояния, при котором снижение уровня полипептида LPA является эффективным при лечении заболевания или состояния, способ и средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения с целью подавления экспрессии LPA. Примеры заболеваний и состояний, которые можно лечить с помощью средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению и терапевтического способа по настоящему изобретению, включают без ограничения болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперполипротеинбетаполипротеинемия, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие

заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц. Такие заболевание и состояние в данном документе могут называться "связанным с LPA заболеванием и состоянием" и "заболеванием и состоянием, вызываемым и/или регулируемым LPA".

В некоторых аспектах настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может быть введено субъекту один или несколько раз до или после диагностики связанного с LPA заболевания или состояния. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъект находится в группе риска возникновения или развития связанного с LPA заболевания или состояния. Субъектами, находящимися в группе риска развития связанного с LPA заболевания или состояния, являются субъекты с повышенной вероятностью развития связанного с LPA заболевания или состояния по сравнению с контролями, находящимися в группе риска развития связанного с LPA заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения уровень риска является статистически значимым по сравнению с контрольным уровнем риска. К субъектам, находящимся в группе риска, могут относиться, например, субъекты, которые являются или будут субъектами с ранее существовавшими заболеваниями и/или генетическими аномалиями, которые делают субъектов более восприимчивыми к связанному с LPA заболеванию или состоянию, чем контрольные субъекты без ранее существовавших заболеваний или генетических аномалий; субъекты с семейным и/или личным анамнезом связанного с LPA заболевания или состояния; и субъекты, которые ранее подвергались лечению связанного с LPA заболевания или состояния. Будет понятно, что ранее существовавшие заболевания и/или генетические аномалии, которые делают субъекта более восприимчивым к связанному с LPA заболеванию или состоянию, могут представлять собой заболевания или генетические аномалии, которые, при их наличии, ранее были определены как ассоциированные с более высокой вероятностью развития связанного с LPA заболевания или состояния.

Будет понятно, что средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть введено субъекту в зависимости от медицинского состояния индивидуального субъекта. Например, в медицинском учреждении, оказывающем услуги субъекту, может быть оценен уровень LPA, измеренный в образце, полученном от субъекта, и может быть определено, что желательно снизить уровень LPA у субъекта путем введения средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению. В одном неограничивающем примере от субъекта может быть получен биологический образец, такой как образец крови или сыворотки крови, и в образце может быть определен уровень LPA у субъекта. Средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA вводят субъекту, и после введения у субъекта получают образец крови или сыворотки крови, и с использованием данного образца измеряют уровень LPA, и результат сравнивают с результатом, определенным в

образце, полученном от субъекта перед введением (предыдущем). По сравнению с уровнем до введения последующее снижение уровня LPA в образце, полученном от субъекта, указывает на эффективность введенного средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA в снижении уровня LPA у субъекта. В одном неограничивающем примере уровень Lp (a) в крови можно считать физиологической характеристикой связанного с LPA состояния, даже если у субъекта не было диагностировано связанное с LPA состояние, такое как раскрытое в данном документе. Медицинский работник может подвергать мониторингу изменения уровней Lp(a) в крови субъекта как показатель эффективности введенного средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению.

Некоторые варианты осуществления способа по настоящему изобретению предусматривают коррекцию лечения, и лечение предусматривает введение средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению субъекту, основываясь, по меньшей мере частично, на оценке вызванных лечением изменений одной или нескольких физиологических характеристик связанных с LPA заболеваний или состояний у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения действие вводимого субъекту средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может быть определено и применено для способствования регулировке количества вводимого в дальнейшем субъекту средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению. В одном неограничивающем примере средство на основе dsRNA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению вводят субъекту, и после введения измеряют уровень Lp (a) в крови субъекта, и, по меньшей мере частично исходя из определенного уровня, определяют, требуется ли большее количество средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для улучшения физиологического эффекта вводимого средства, такого как снижение или дополнительное снижение уровня Lp (a) в крови субъекта. В другом неограничивающем примере средство на основе dsRNA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению вводят субъекту и после введения определяют уровень Lp (a) в крови субъекта, и, ожидается, что, по меньшей мере частично исходя из определенного уровня, субъекту будут вводить более низкое количество средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA.

Таким образом, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают оценивание вызванных предшествующим лечением субъекта изменений одной или нескольких физиологических характеристик для корректировки количества средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению, впоследствии вводимого субъекту. Некоторые варианты осуществления способа по настоящему изобретению предусматривают измерение

физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более раз, оценивание и/или мониторинг эффективности вводимого средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению и необязательно корректировку одного или нескольких из следующих параметров с использованием результатов измерений: дозировки, схемы введения доз и/или частоты введения доз средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению для лечения связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению требуемый результат введения эффективного количества средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению субъекту заключается в том, что уровень Lp(a) в крови субъекта снижается по сравнению с предыдущим уровнем Lp(a) в крови, определенным для субъекта; уровень Lp(a) в крови субъекта находился в пределах нормального диапазона.

Используемые в данном документе термины "лечить", "терапевтический" или "подвергаемый лечению" при их использовании в отношении связанного с LPA заболевания или состояния могут относиться к профилактическому лечению, снижению вероятности развития связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта и могут также относиться к лечению, направленному на устранение или снижение уровня проявления связанного с LPA заболевания или состояния после того, как у субъекта развилось связанное с LPA заболевание или состояние, предупреждению развития более тяжелого связанного с LPA заболевания или состояния и/или замедлению прогрессирования связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта по сравнению с субъектом в отсутствие терапии, которая снижает уровень полипептида LPA у субъекта.

Определенные варианты осуществления средств, композиций и способов по настоящему изобретению могут быть использованы для подавления экспрессии гена LPA. Используемые в данном документе в отношении экспрессии гена LPA термины "подавлять", "подвергать сайленсингу", "снижать", "супрессировать" и "подвергать нокдауну" относятся, например, к изменению экспрессии гена LPA по одному или нескольким из следующих показателей: уровню РНК, транскрибируемой с гена, уровню экспрессируемого LPA, и уровень полипептида, белка или белковой субъединицы LPA, которые транслируются с mRNA в клетке, клеточной популяции, ткани, органе или у субъекта, снижается, когда клетку, клеточную популяцию, ткань, орган или субъекта приводят в контакт (например, обрабатывают) со средством на основе dsRNA LPA или средством на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению по сравнению с контрольным уровнем РНК, транскрибируемой с гена LPA, контрольным уровнем LPA, транслируемого с mRNA, соответственно. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень представляет собой уровень в клетках, тканях, органах или у субъектов, не контактирующих (например, не подвергаемых обработке) со средствами на основе dsRNA LPA или средствами на основе антисмыслового

полинуклеотида LPA.

Способ применения

В способе по настоящему изобретению могут быть использованы различные пути введения средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA. Выбор конкретного режима доставки будет зависеть, по меньшей мере частично, от конкретного подлежащего лечению состояния и дозы, необходимой для терапевтической эффективности. В целом, способ по настоящему изобретению может быть осуществлен с применением любого приемлемого с медицинской точки зрения режима введения доз, что означает любой режим, который обеспечивает эффективный терапевтический уровень при связанных с LPA заболеваниях или состояниях, не вызывая клинически неприемлемых побочных эффектов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA могут быть введены перорально, энтерально, через слизистую оболочку, подкожно и/или парентерально. Термин "парентеральный" включает методики подкожной, внутривенной, интратекальной, внутримышечной, внутрибрюшинной и интратеральной инъекции или инфузии. Другие пути введения включают без ограничения назальный (например, через назогастральный зонд), чрескожный, вагинальный, ректальный, подъязычный и ингаляционный. Путь доставки по настоящему изобретению может предусматривать интратекальный, внутрижелудочковый или интракраниальный. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть помещено в матрицу для замедленного высвобождения и введено путем помещения матрицы в организм субъекта. В некоторых аспектах настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть доставлено в клетки субъекта с применением наночастиц, покрытых средствами для доставки, нацеленными на конкретные клетки или органеллы. Из уровня техники известны различные варианты, способы и средства для доставки. Неограничивающие примеры способов доставки и средств для доставки представлены в другом месте в данном документе. В некоторых аспектах настоящего изобретения термин "доставка" по отношению к средству на основе dsRNA LPA или средству на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может относиться к введению одной или нескольких "голых" последовательностей средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA в клетку или субъекту. В определенных аспектах настоящего изобретения "доставка" относится к доставке в клетку или субъекту путем трансфекции, доставке клетки, содержащей средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, субъекту, доставке вектора, кодирующего средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, в клетку и/или субъекту и т. п. Доставка средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA с применением режима трансфекции может предусматривать введение вектора в клетку и/или субъекту.

В некоторых способах по настоящему изобретению одно или несколько средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмысловых полинуклеотидов LPA могут быть введены в форме состава или в фармацевтически приемлемых растворах, которые обычно могут содержать фармацевтически приемлемые концентрации солей, буферов, консервантов, совместимых носителей, вспомогательных средств и необязательно других терапевтических ингредиентов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть составлено с другим терапевтическим средством для одновременного введения. Согласно способу по настоящему изобретению средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть введено в форме фармацевтической композиции. Как правило, фармацевтическая композиция содержит средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA и необязательно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель хорошо известен специалистам в данной области техники. В контексте данного документа фармацевтически приемлемый вектор относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность биологической активности активного ингредиента (например, способность средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA подавлять экспрессию гена LPA в клетках или у субъектов). Различные способы введения и доставки средства на основе dsRNA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для терапевтического применения известны из уровня техники и могут быть использованы в способах по настоящему изобретению.

Фармацевтически приемлемые носители включают разбавители, наполнители, соли, буферы, стабилизаторы, солюбилизаторы и другие материалы, известные из уровня техники. Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители описаны в патенте США № 5211657, тогда как другие носители известны специалистам в данной области техники. Такие составы обычно могут содержать соли, буферы, консерванты, совместимые носители и необязательно другие терапевтические средства. Соли должны быть фармацевтически приемлемыми для применения в медицине, но для получения их фармацевтически приемлемых солей в целях удобства могут быть использованы не фармацевтически приемлемые соли, и они не исключены из объема настоящего изобретения. Такие фармакологически и фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли, полученные из соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты, малеиновой кислоты, уксусной кислоты, салициловой кислоты, лимонной кислоты, муравьиной кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты и т. п. Более того, фармацевтически приемлемые соли могут быть получены в виде солей щелочных металлов или солей щелочноземельных металлов, таких как соли натрия, соли калия или соли кальция.

Некоторые варианты осуществления способа по настоящему изобретению предусматривают введение одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA или

средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA непосредственно в ткани. В некоторых вариантах осуществления ткань, в которую вводят соединение, представляет собой ткань, в которой присутствуют или могут развиваться связанные с LPA заболевания или состояния, неограничиваемыми примерами ткани являются печень или почка. Непосредственное введение в ткань может быть осуществлено путем прямой инъекции или другими способами. Многие перорально доставляемые соединения естественным образом проникают и проходят через печень и почки, и некоторые варианты осуществления терапевтического способа по настоящему изобретению предусматривают пероральное введение субъекту одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA. Средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами, могут быть введены один раз или могут быть введены несколько раз. При введении несколько раз средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть введено разными путями. Например, хотя это и не является ограничивающим, первое введение (или несколько первых введений) может быть осуществлено подкожно, а одно или несколько дополнительных введений могут быть пероральными и/или системными.

В случае вариантов осуществления настоящего изобретения, в которых требуется вводить средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA системно, средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть составлено для парентерального введения путем инъекции, например, болюсной или непрерывной инфузии. Инъекционные составы могут быть представлены в виде стандартных лекарственных форм, таких как ампулы, или в многодозовых контейнерах с консервантами или без них. Составы со средствами на основе dsRNA LPA (также называемые фармацевтическими композициями) могут быть представлены в форме суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие средства, стабилизаторы и/или диспергирующие вещества.

Составы для парентерального введения предусматривают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и буферные среды. Носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с глюкозой, раствор глюкозы и хлорида натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучее масло. Вспомогательные вещества для внутривенного введения включают жидкости и пищевые добавки, электролитные добавки (например, на основе раствора Рингера с глюкозой) и т. п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т. п. При других

формах введения, например, при внутривенном введении, дозы будут ниже. Если ответ субъекта на начальную дозу не является достаточным, может быть использована более высокая доза в пределах переносимости пациента (или доза может быть эффективно увеличена посредством другого, более локализованного пути доставки). При необходимости могут быть использованы несколько доз в сутки для достижения соответствующих системных или местных уровней одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA и для достижения соответствующего снижения уровней белка LPA.

В других вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает применение носителей для доставки, таких как биосовместимые микрочастицы, наночастицы или имплантаты, подходящие для имплантации реципиентам, таким как субъекты. Иллюстративные биоразрушаемые имплантаты, которые могут быть использованы в соответствии с данным способом, описаны в публикации согласно РСТ WO 95/24929 (включенной в данный документ посредством ссылки), в которой описана биосовместимая биоразрушаемая полимерная матрица для включения биомакромолекул.

В способе по настоящему изобретению для доставки субъекту одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA могут быть использованы как небiorазрушаемые, так и биоразрушаемые полимерные матрицы. В некоторых вариантах осуществления матрица может быть биоразрушаемой. Матричный полимер может представлять собой природный или синтетический полимер. Полимер может быть выбран, исходя из требуемого периода высвобождения, обычно от нескольких часов до года или больше. Обычно может быть использовано высвобождение в течение периода времени от нескольких часов до трех - двенадцати месяцев. Полимер необязательно находится в форме гидрогеля, который может поглощать до приблизительно 90% воды от своего веса, а также необязательно сшит с поливалентными ионами или другими полимерами.

В целом, средство на основе dsRNA LPA или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA может быть доставлено в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения с применением биоразрушаемых имплантатов путем диффузии или путем разрушения полимерной матрицы. Иллюстративные синтетические полимеры для данного применения хорошо известны из уровня техники. С применением способов, известных из уровня техники, для доставки средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA могут быть использованы биоразрушаемые полимеры и небiorазрушаемые полимеры. Биоадгезивные полимеры, такие как биоразлагаемые гидрогели (H.S. Sawhney, C.P. Pathak и J.A. Hubell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587), также могут быть использованы для доставки средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA для лечения связанных с LPA заболеваний или состояний. Другие подходящие системы доставки могут включать системы доставки с высвобождением по времени, отсроченным высвобождением или замедленным высвобождением. Такие системы позволяют избежать

повторного введения средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, тем самым повышая удобство для субъектов и медицинских работников. Многие типы систем доставки и высвобождения доступны и известны специалистам в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5075109, 4452775, 4675189, 5736152, 3854480, 5133974 и 5407686. Кроме того, могут быть использованы помповые аппаратные системы доставки, некоторые из которых также подходят для имплантации.

Применение имплантатов с долговременным замедленным высвобождением может быть адаптировано для профилактического лечения субъектов и субъектов, находящихся в группе риска развития рецидивирующих связанных с LPA заболеваний или состояний. В контексте данного документа долговременное высвобождение относится к конструкции и расположению имплантатов для доставки терапевтического уровня средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA в течение периода времени, составляющего по меньшей мере до 10 дней, 20 дней, 30 дней, 60 дней, 90 дней, шести месяцев, одного года или дольше. Имплантаты с долговременным замедленным высвобождением хорошо известны специалистам в данной области техники и включают некоторые из описанных выше систем для высвобождения.

Терапевтические составы со средством на основе dsRNA LPA или средством на основе антисмыслового полинуклеотида LPA могут быть подготовлены для хранения путем смешивания молекул или соединений с требуемой чистотой с необязательным фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом или стабилизатором [Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, (2006)] в виде лиофилизированного состава или водного раствора. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и с другими органическими кислотами; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутанол или бензиловый спирт; парабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярный (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; соли, образующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN®, PLURONICS® или полиэтиленгликоль (PEG).

Клетки, субъекты и контроли

Способы по настоящему изобретению могут быть использованы в сочетании с клетками, тканями, органами и/или субъектами. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъектами являются люди или позвоночные млекопитающие, в том числе без ограничения собаки, кошки, лошади, коровы, козы, мыши, крысы и приматы, такие как обезьяны. Следовательно, настоящее изобретение может быть использовано для лечения связанных с LPA заболеваний или состояний как у людей, так и у субъектов, отличных от людей. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъект может представлять собой сельскохозяйственное животное, животное из зоопарка, одомашненное животное или неодомашненное животное, и способ по настоящему изобретению может быть использован в ветеринарных профилактических и терапевтических схемах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является человек, и способ по настоящему изобретению может быть использован в профилактических и терапевтических схемах для человека.

Неограничивающими примерами субъектов, в отношении которых может быть использовано настоящее изобретение, являются субъекты с диагнозом, подозрением на наличие или риском развития заболевания или состояния, ассоциированного с экспрессией LPA выше ожидаемой экспрессии, что также называется "повышенным уровнем экспрессии LPA". Неограничивающие примеры заболевания и состояния, ассоциированных с более высоким, чем ожидаемый, уровнем экспрессии LPA, описаны в другом месте данного документа. Способ по настоящему изобретению может быть использован в отношении субъектов, у которых на момент лечения было диагностировано заболевание или состояние, в отношении субъектов, ассоциированных с экспрессией LPA выше ожидаемой экспрессии, или в отношении субъектов, которые считаются находящимися в группе риска возникновения или развития заболевания или состояния, ассоциированного с экспрессией LPA выше ожидаемой экспрессии. В некоторых аспектах настоящего изобретения заболевание или состояние, ассоциированное с уровнем экспрессии LPA выше ожидаемого уровня, представляет собой острое заболевание или состояние; в некоторых аспектах настоящего изобретения заболевание или состояние, связанное с уровнем экспрессии LPA выше ожидаемого уровня, представляет собой хроническое заболевание или состояние.

В одном неограничивающем примере средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению вводят субъекту, у которого диагностировано сердечно-сосудистое заболевание, где сердечно-сосудистое заболевание включает болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперapoлипопротеинбетапопротеинемию, цереброваскулярный атеросклероз,

цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц. Способ по настоящему изобретению может быть использован в отношении субъектов, у которых на момент лечения было диагностировано заболевание или состояние или которые считаются находящимися в группе риска возникновения или развития заболевания или состояния.

В другом неограничивающем примере средство на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению вводят для лечения заболевания или нарушения, которое вызвано или ассоциировано с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS) или симптомы или прогрессирование которого отвечают на инактивацию RAAS. Термин "связанное с LPA заболевание" включает заболевание, нарушение или состояние, при котором является полезным снижение экспрессии LPA. Эти заболевания обычно ассоциированы с высоким кровяным давлением. Неограничивающие примеры связанных с LPA заболеваний включают сердечно-сосудистые заболевания, в том числе болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперapoлипопротеинбетапопротеинемия, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц.

Клетки, в отношении которых может быть использован способ по настоящему изобретению, предусматривают клетки *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. Клетки могут находиться в организме субъекта, в культуре и/или суспензии или в любом другом подходящем состоянии или условии. Клетки, в отношении которых может быть использован способ по настоящему изобретению, могут представлять собой клетки печени, гепатоциты, клетки сердца, клетки поджелудочной железы, сердечно-сосудистые клетки, клетки почки или другие типы клеток позвоночных, в том числе клетки человека и отличных от человека млекопитающих. В некоторых аспектах настоящего изобретения клетки, в отношении которых может быть использован способ по настоящему изобретению, представляют собой здоровые нормальные клетки, о которых не известно, что они являются пораженными заболеванием клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции по настоящему изобретению применяют в отношении клеток, таких как клетки печени, гепатоциты, клетки сердца, клетки поджелудочной железы, сердечно-сосудистые клетки и/или клетки почки. В определенных аспектах

настоящего изобретения контрольные клетки представляют собой нормальные клетки, но следует понимать, что в отдельных случаях в качестве контрольных клеток также могут быть использованы клетки с заболеванием или состоянием, например, в случае сравнения результатов обработанных клеток с заболеванием или состоянием с результатами необработанных клеток с заболеванием или состоянием и т. п.

Согласно способу по настоящему изобретению уровни полипептида LPA можно определить и сравнить с контрольными уровнями полипептида LPA. Контроль может представлять собой заранее определенную величину, которая может принимать различные формы. Он может представлять собой одиночное пороговое значение, например, медианное или среднее значение. Он может быть установлен на основании групп сравнения, например, в группах с нормальными уровнями полипептида LPA и в группах с повышенными уровнями активности полипептида LPA. Другим неограничивающим примером группы сравнения может быть популяция с одним или несколькими симптомами или диагнозами связанного с LPA заболевания или состояния по сравнению с популяцией без одного или нескольких симптомов или диагнозов заболевания или состояния; группа субъектов, которым было введено средство лечения на основе siRNA по настоящему изобретению, по сравнению с группой субъектов, которым не было введено средство лечения на основе siRNA по настоящему изобретению. Как правило, контроли могут происходить из внешне здоровых нормальных индивидуумов или очевидно здоровых клеток в соответствующей возрастной группе. Будет понятно, что в дополнение к предварительно определенным значениям контроль согласно настоящему изобретению может представлять собой образец материала, тестируемый параллельно с экспериментальным материалом. Примеры включают образцы из контрольных популяций или контрольные образцы, полученные посредством обработки для параллельного тестирования с экспериментальными образцами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контроль может включать клетки или субъектов, которые не приведены в контакт со средством на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению или не обработаны им, в таком случае контрольный уровень полипептида LPA можно сравнивать с уровнем полипептида LPA в клетках или у субъектов, контактирующих со средством на основе dsRNA LPA или средством на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контрольный уровень может представлять собой уровень полипептида LPA, определенный для субъекта, где уровень полипептида LPA, определенный для одного и того же субъекта в разные моменты времени, сравнивают с контрольным уровнем. В одном неограничивающем примере уровни LPA определяют в биологических образцах, полученных от субъектов, которые никогда не получали обработку LPA согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой образец сыворотки крови. Уровни полипептида LPA, измеренные в образцах, полученных от субъекта, могут служить исходными или контрольными

значениями для субъекта. После введения субъекту одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA согласно терапевтическому способу по настоящему изобретению у субъекта могут быть получены один или несколько дополнительных образцов сыворотки крови и можно сравнить уровни полипептида LPA в следующих одном или нескольких образцах с контрольными/исходными уровнями у субъекта. Такие сравнения могут быть использованы для оценки начала, прогрессирования или регрессии связанных с LPA заболеваний или состояний у субъектов. Например, уровень полипептида LPA в полученном от субъекта образце на исходном уровне выше, чем уровень, полученный от того же субъекта после введения субъекту средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению, что указывает на регрессию связанного с LPA заболевания или состояния и эффективность введенного средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению при лечении связанного с LPA заболевания или состояния.

В определенных аспектах настоящего изобретения в качестве контрольного значения могут быть использованы одно или несколько значений уровней полипептида LPA, определенных для субъекта, и использованы для последующего сравнения уровней полипептида LPA у одного и того же субъекта, что таким образом позволяет оценить изменения относительно "исходного" уровня полипептида LPA у субъекта. Таким образом, если в качестве контрольного уровня у субъекта используют начальный уровень, начальный уровень полипептида LPA может быть использован для отображения и/или определения уровня полипептида LPA у субъекта, который у субъекта может быть снижен посредством способов и соединений по настоящему изобретению.

С применением способа по настоящему изобретению средство на основе dsRNA LPA и/или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может быть введено субъекту. Такие средства для dsRNAi включают, например, дуплексы, показанные в таблице 1. В некоторых других вариантах осуществления такие средства для dsRNAi включают дуплексные варианты, например, варианты, показанные в таблице 1. Эффективность введения и лечения по настоящему изобретению может быть оценена следующим образом: после введения и лечения уровень полипептида LPA в образце сыворотки крови, полученном от субъекта, снижается на по меньшей мере 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с уровнем полипептида LPA до введения в образце сыворотки крови, полученном от субъекта в предыдущей временной точке, или по сравнению с уровнем контроля, не приведенного в контакт (например, уровнем полипептида LPA в контрольном образце сыворотки крови). Будет понятно, что все уровни полипептидов LPA ассоциированы с уровнями экспрессии гена LPA. Некоторые варианты осуществления способа по настоящему изобретению предусматривают введение средства на основе dsRNA LPA и/или на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению субъекту в количестве, которое эффективно подавляет экспрессию гена LPA, тем самым снижая уровень полипептида LPA у субъекта.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают определение присутствия, отсутствия и/или количества (в данном документе также называемого уровнем) полипептида LPA из одного или нескольких биологических образцов, полученных от одного или нескольких субъектов. Данное определение может быть использовано для оценки эффективности терапевтического способа по настоящему изобретению. Например, способы и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для определения уровня полипептида LPA в биологическом образце, полученном от субъекта, которого ранее лечили средством на основе dsRNA LPA и/или средством на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению. После введения и лечения уровень полипептида LPA в образце сыворотки крови, полученном от субъекта, снижается на по меньшей мере 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с уровнем полипептида LPA до введения в образце сыворотки крови, полученном от субъекта в предыдущей временной точке, или по сравнению с уровнем контроля, не приведенного в контакт (например, уровнем полипептида LPA в контрольном образце сыворотки крови), что указывает на уровень эффективности вводимого субъекту средства лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения физиологические характеристики связанного с LPA заболевания или состояния, определенные для субъекта, могут служить контрольным результатом, и с контрольным результатом сравнивают результаты определения физиологических характеристик у одного и того же субъекта в разные моменты времени. В одном неограничивающем примере уровень Lp(a) в крови (и/или другие физиологические характеристики связанного с LPA заболевания или состояния) измеряют у субъекта, который никогда не получал средство лечения, направленное на LPA, согласно настоящему изобретению, и он может быть использован в качестве исходного или контрольного значения для субъекта. После введения субъекту одного или нескольких средств на основе dsRNA LPA в соответствии с терапевтическим способом по настоящему изобретению измеряют уровни Lp(a) в крови и сравнивают их с контрольными/исходными уровнями у субъекта соответственно. Такие сравнения могут быть использованы для оценки начала, прогрессирования или регрессии связанных с LPA заболеваний или состояний у субъектов. Например, если исходный уровень LPA, полученный у субъекта, выше, чем уровень LPA, измеренный у того же субъекта после введения субъекту средства на основе dsRNA LPA или средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению, то это указывает на регрессию связанного с LPA заболевания или состояния и эффективность введенного средства на основе dsRNA LPA по настоящему изобретению при лечении связанного с LPA заболевания или состояния.

В некоторых аспектах настоящего изобретения значение одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния, определенное для субъекта, может быть использовано в качестве контрольного значения для последующих сравнений физиологических характеристик у того же субъекта, что

таким образом позволяет осуществлять оценку изменений относительно "исходных" физиологических характеристик субъекта. Таким образом, у индивидуума может быть получена изначальная физиологическая характеристика, и измерение изначальной физиологической характеристики используется в качестве контроля для субъекта, а также для демонстрации и/или определения эффекта, который может быть использован в случае способа и соединения по настоящему изобретению для снижения уровня полипептида LPA у индивидуума. С применением способа по настоящему изобретению средство на основе dsRNA LPA и/или средство на основе антисмыслового полинуклеотида LPA по настоящему изобретению может быть введено субъекту в эффективном количестве для лечения связанного с LPA заболевания или состояния. Эффективность введения и лечения по настоящему изобретению может быть оценена путем определения изменений одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния. В одном неограничивающем примере уровень Lp(a) в крови субъекта снижают до тех пор, пока уровни Lp(a) в крови субъекта не достигнут нормального диапазона по сравнению с уровнем Lp(a) в крови, полученным у субъекта в предыдущей временной точке, или по сравнению с уровнем LPA в контроле, не приведенном в контакт.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают определение наличия, отсутствия и/или изменения физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния с применением таких способов, как без ограничения следующие: (1) измерение уровней Lp(a) в крови субъекта; (2) оценивание физиологических характеристик одного или нескольких биологических образцов, полученных от одного или нескольких субъектов; (3) или проведение физикального осмотра субъекта. Данное определение может быть использовано для оценки эффективности терапевтического способа по настоящему изобретению.

Набор

Также в объем настоящего изобретения входят набор, содержащий одно или несколько средств на основе dsRNA LPA и/или средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA и инструкции по их применению в способе по настоящему изобретению. Набор по настоящему изобретению может содержать одно или несколько из средства на основе dsRNA LPA, средства на основе смыслового полинуклеотида LPA и средства на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, которые могут быть использованы для лечения связанного с LPA заболевания или состояния. Набор, содержащий одно или несколько средств на основе dsRNA LPA, средств на основе смыслового полинуклеотида LPA и средств на основе антисмыслового полинуклеотида LPA, может быть получен для применения в терапевтических способах по настоящему изобретению. Компоненты набора по настоящему изобретению могут быть упакованы в водную среду или лиофилизированную форму. Набор по настоящему изобретению может содержать подставку, которая разделена для размещения на ней одного или нескольких контейнерных устройств или ряда контейнерных устройств (например, тестовых пробирок, флаконов, колб, бутылок, шприцев и т. п.). Первое контейнерное устройство

или ряд контейнерных устройств могут содержать одно или несколько соединений, таких как средство на основе dsRNA LPA и/или средство на основе смыслового или антисмыслового полинуклеотида LPA. Второе контейнерное устройство или ряд контейнерных устройств могут содержать нацеливающее средство, средство для мечения, средство для доставки и т. п., которые могут быть включены как часть средства на основе dsRNA LPA и/или антисмыслового полинуклеотида LPA, вводимых в варианте осуществления терапевтического способа по настоящему изобретению.

Набор по настоящему изобретению также может содержать инструкции. Инструкции обычно имеют письменную форму и будут содержать руководство по осуществлению лечения, реализуемого с помощью набора, а также принятию решений по результатам данного лечения.

Следующие примеры представлены для иллюстрации конкретных примеров реализации на практике настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Для специалистов в данной области техники очевидно, что настоящее изобретение может быть использовано в отношении множества композиций и способов.

Примеры

Пример 1. Синтез средства для RNAi

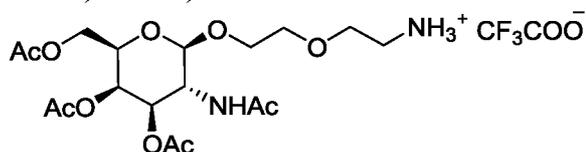
Дуплекс средства для RNAi LPA, показанный выше в таблицах 2-3, синтезировали в соответствии со следующей общей процедурой.

Последовательности смысловой и антисмысловой нитей siRNA синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов с применением общепризнанного способа твердофазного синтеза, основанного на химии фосфорамидитов. Рост олигонуклеотидной нити достигается посредством 4-стадийного цикла: удаления защитной группы, конденсации, кэпирования и стадии окисления или сульфуризации для добавления каждого нуклеотида. Синтез проводили на твердой подложке, выполненной из пористого стекла с контролируемым размером пор (CPG, 1000 Å). Мономерный фосфорамидит приобретали из коммерческих источников. Фосфорамидиты с кластерами GalNAc-содержащих лигандов (GLPA1 и GLPA2 в качестве неограничивающих примеров) синтезировали в соответствии с процедурой из примеров 2-3 в данном документе. Синтез молекул siRNA, применяемых для скрининга *in vitro* (таблица 2), проводили в масштабе 2 мкмоль; в случае siRNA, применяемых для теста *in vivo* (таблицы 3, 4-5), масштаб синтеза составлял 5 мкмоль или больше. В случае, когда GalNAc-содержащий лиганд (GLO-0 в качестве неограничивающего примера) был связан с 3'-концом смысловой нити, использовали твердую подложку из CPG со связанным GalNAc-содержащим лигандом. В случае, когда GalNAc-содержащий лиганд (GLS-1 или GLS-2 в качестве неограничивающего примера) был связан с 5'-концом смысловой нити, для конечной реакции сочетания применяли GalNAc-содержащий фосфорамидит (GLPA1 или GLPA2 в качестве неограничивающего примера). Для удаления защитной группы, то есть 4,4'-диметокситрифенилметила (DMT), применяли трихлоруксусную кислоту (TCA) в 3% дихлорметане. В качестве активатора

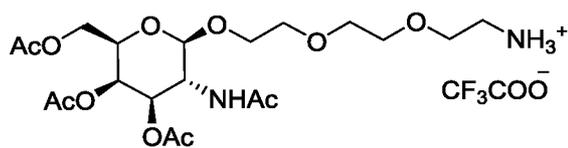
применяли 5-этилтио-1H-тетразол. I₂ в THF/Py/H₂O и фенилацетилдисульфид (PADS) в смеси пиридин/MeCN применяли для реакций окисления и сульфуризации соответственно. После заключительной стадии твердофазного синтеза связанный с твердой подложкой олигомер отщепляли посредством обработки с помощью 40 вес. % водного раствора метиламина и 28% раствора гидроксида аммония в соотношении 1 : 1 по объему и удаляли защитную группу. Неочищенную смесь концентрировали для синтеза молекул siRNA для скрининга *in vitro*. Оставшиеся твердые вещества растворяли в 1,0 М NaOAc и добавляли ледяной EtOH для осаждения однонитового продукта в виде натриевой соли, который можно было применять для отжига без дополнительной очистки. Для синтеза siRNA для тестирования *in vivo* неочищенный однонитовый продукт дополнительно очищали посредством ион-парной обращеннофазовой HPLC (IP-RP-HPLC). Очищенные однонитовые олигонуклеотидные продукты, полученные посредством IP-RP-HPLC, превращали в натриевые соли путем их растворения в 1,0 М NaOAc и их осаждения посредством добавления ледяного EtOH. Отжиг смысловых и антисмысловых олигонуклеотидов путем эквимольной комплементации проводили в воде с образованием продукта, представляющего собой двухнитовую siRNA, который лиофилизировали с получением рыхлого белого твердого вещества.

Пример 2. Получение промежуточного соединения А и промежуточного соединения В

Промежуточное соединение А синтезировали путем обработки коммерчески доступного пентаацетата галактозамина с помощью триметилсилилтрифторметансульфоната (TMSOTf) в дихлорметане (DCM), как показано ниже на схеме 1. Затем проводили гликозилирование с помощью Cbz-защищенного 2-(2-аминоэтокси)этан-1-ола с получением соединения II. Защитную группу Cbz удаляли посредством гидрогенизации с получением промежуточного соединения А в виде трифторацетатной (TFA) соли. Промежуточное соединение В синтезировали по той же схеме, за исключением применения в качестве сырья Cbz-защищенного 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этан-1-ола.



Промежуточное соединение А



Промежуточное соединение В

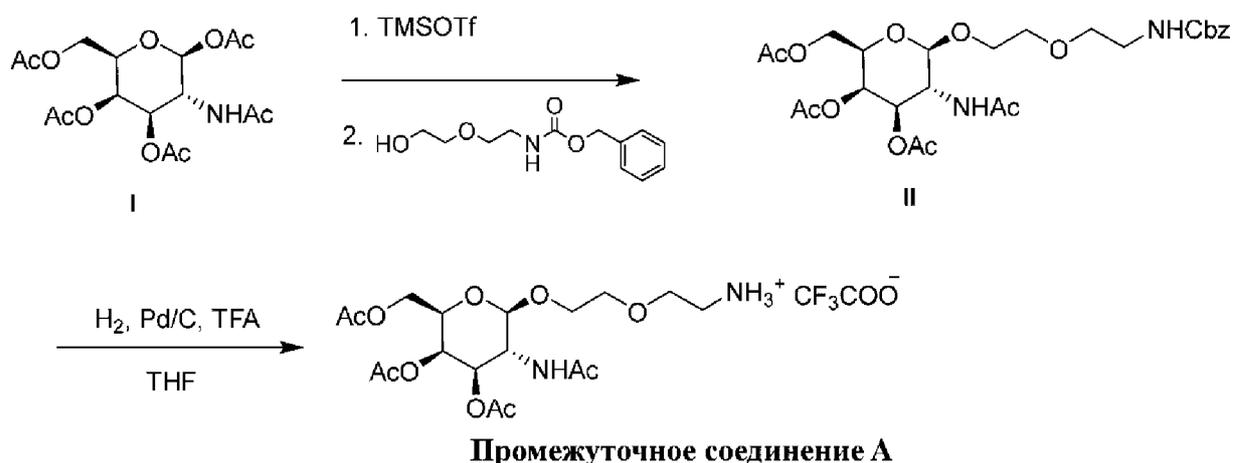


Схема 1

TMSOTf (17,1 г, 77,2 ммоль) добавляли в раствор соединения I (20,0 г, 51,4 ммоль) в 100 мл 1,2-дихлорэтана (DCE). Полученную реакционную жидкость перемешивали при 60°C в течение 2 ч, а затем перемешивали при 25°C в течение 1 ч; Cbz-защищенный 2-(2-аминоэтокси)этан-1-ол (13,5 г, 56,5 ммоль) высушивали над порошкообразными молекулярными ситами с размером пор 4 Å (10 г) в DCE (100 мл) и по каплям добавляли к указанной выше реакционной жидкости при 0°C в атмосфере N₂. Полученную реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Реакционную смесь фильтровали и промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (200 мл), водой (200 мл) и насыщенным соевым раствором (200 мл). Органический слой высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который растирали в порошок со смесью 2-метилтетрагидрофуран/гептан (5/3, объем/объем, 1,80 л) в течение 2 ч. Полученную смесь фильтровали и высушивали с получением соединения II (15,0 г, выход 50,3%) в виде белого твердого вещества.

10% Pd/C (1,50 г) осторожно добавляли в сухую и продутую аргоном бутылку для гидрогенизации и затем добавляли 10 мл тетрагидрофурана (THF) с последующим добавлением раствора соединения II (15,0 г, 26,4 ммоль) в THF (300 мл) и TFA (трифторуксусная кислота, 3,00 г, 26,4 ммоль). Полученную смесь дегазировали и три раза продували с помощью H₂ и перемешивали при 25°C в атмосфере H₂ (45 фунтов/кв. дюйм) в течение 3 ч. Результаты тонкослойной хроматографии (TLC, растворитель: DCM:MeOH=10:1) указывали на то, что соединение II было полностью израсходовано. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в безводном DCM (500 мл) и концентрировали. Способ повторяли 3 раза с получением промежуточного соединения А в виде пенистого белого твердого вещества (14,0 г, выход 96,5%). ¹H ЯМР (400 МГц DMSO-*d*₆): δ ppm 7,90 (d, *J*=9,29 Гц, 1 H), 7,78 (br s, 3 H), 5,23 (d, *J*=3,26 Гц, 1 H), 4,98 (dd, *J*=11,29, 3,26 Гц, 1 H), 4,56 (d, *J*=8,53 Гц, 1 H), 3,98-4,07 (m, 3 H), 3,79-3,93 (m, 2 H), 3,55-3,66 (m, 5 H), 2,98 (br d, *J*=4,77 Гц, 2 H), 2,11 (s, 3 H), 2,00 (s, 3 H), 1,90 (s, 3 H), 1,76 (s, 3 H).

Промежуточное соединение В синтезировали с применением процедуры, схожей с процедурой, которую применяли для синтеза промежуточного соединения А. ^1H ЯМР (400 МГц $\text{DMSO-}d_6$): δ ppm 7,90 (br d, $J=9,03$ Гц, 4 H), 5,21 (d, $J=3,51$ Гц, 1 H), 4,97 (dd, $J=11,1$ Гц, 1 H), 4,54 (d, $J=8,53$ Гц, 1 H), 3,98-4,06 (m, 3 H), 3,88 (dt, $J=10,9$ Гц, 1 H), 3,76-3,83 (m, 1 H), 3,49-3,61 (m, 9 H), 2,97 (br s, 2 H), 2,10 (s, 3 H), 1,99 (s, 3 H), 1,88 (s, 3 H), 1,78 (s, 3 H). Масса, рассчитанная посредством спектрометрии: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$: 478,22; , измеренная масса : 479,3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

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

GLPA1 и GLPA2 получали согласно представленной далее схеме 2. Начиная с бензил-защищенного пропан-1,3-диамина, алкилирование проводили с применением трет-бутил-2-бромацетата с получением триэфирного соединения I. Защитную бензильную группу удаляли посредством гидрогенизации с получением соединения II, представляющего собой вторичный амин. Амид подвергали сочетанию с 6-гидроксикапроновой кислотой с получением соединения III. Трет-бутильную защитную группу затем удаляли путем обработки с помощью HCl в диоксане с получением трехкислотного соединения IV. Проводили амидное сочетание между трехкислотным соединением IV и промежуточным соединением А или промежуточным соединением В с получением соединения Va или Vb. Фосфорамидит GLPA1 или GLPA2 синтезировали путем фосфитилирования соединения Va или Vb с помощью 2-цианоэтил-N, N-диизопропилхлорфосфорамидита и каталитического количества 1H-тетразола.

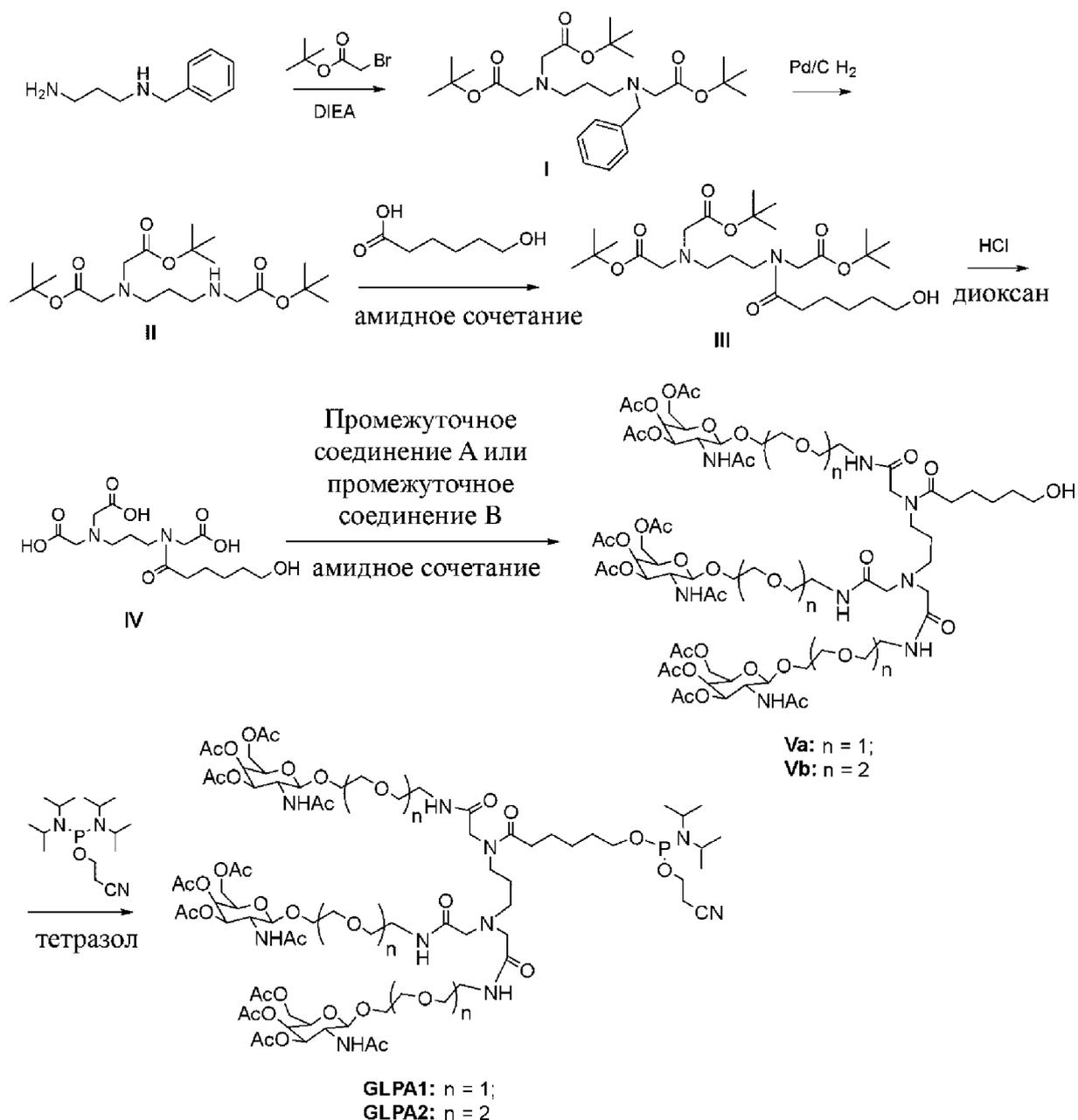


Схема 2

Трет-бутил-2-бромацетат (23,7 г, 121 ммоль) добавляли в раствор N-бензил-1,3-пропандиамина (5,00 г, 30,4 ммоль) в диметилформамиде (DMF, 100 мл); затем по каплям добавляли диизопропилэтиламин (DIEA, 23,61 г, 182 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 16 ч. Результаты LCMS демонстрировали, что N-бензил-1,3-пропандиамин был полностью израсходован. Реакционную смесь разбавляли с помощью H₂O (500 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (500 мл x 2). Объединенные органические вещества промывали насыщенным солевым раствором (1 л), высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: петролейный эфир:этилацетат от 20:1 до 5:1). Получали соединение I (12,1 г, выход 78,4%) в виде бесцветного масла.¹H

ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ ppm 7,26-7,40 (m, 5 H), 3,79 (s, 2 H), 3,43 (s, 4 H), 3,21 (s, 2 H), 2,72 (dt, $J=16,9, 7,34$ Гц, 4 H), 1,70 (quin, $J=7,2$ Гц, 2 H), 1,44-1,50 (m, 27 H).

Высушенную бутылку для гидрогенизации 3 раза продували аргоном. Добавляли Pd/C (200 мг, 10%), затем MeOH (5 мл) с последующим добавлением раствора соединения I (1,00 г, 1,97 ммоль) в MeOH (5 мл). Реакционную смесь дегазировали в вакууме и снова заполняли H_2 . Данный процесс повторяли 3 раза. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч в атмосфере H_2 (15 фунтов/кв. дюйм). Результаты LCMS демонстрировали, что соединение I полностью израсходовалось. Реакционную смесь фильтровали при пониженном давлении в атмосфере N_2 . Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения II (655 мг, выход 79,7%) в виде желтого масла, которое можно было использовать на следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ ppm 3,44 (s, 4 H), 3,31 (s, 2 H), 2,78 (t, $J=7,1$ Гц, 2 H), 2,68 (t, $J=6,9$ Гц, 2 H), 1,88 (br s, 1 H), 1,69 (quin, $J=7,03$ Гц, 2 H), 1,44-1,50 (s, 27 H).

Смесь соединения II (655 мг, 1,57 ммоль), 6-гидроксигексановой кислоты (249 мг, 1,89 ммоль), DIEA (1,02 г, 7,86 ммоль), гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI, 904 мг, 4,72 ммоль) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT, 637 мг, 4,72 ммоль) в DMF (6 мл) дегазировали и три раза продували с помощью N_2 , затем перемешивали при 25°C в атмосфере N_2 в течение 3 ч. Результаты LCMS указывали на требуемый продукт. Реакционную смесь разбавляли с помощью H_2O (10 мл) и экстрагировали с помощью 20 мл EtOAc (10 мл \times 2). Органические вещества объединяли, промывали насыщенным солевым раствором (20 мл), высушивали с помощью безводного Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: петролейный эфир:этилацетат от 5:1 до 1:1) с получением соединения III (650 мг, выход 77,8%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ ppm 3,90-3,95 (s, 2 H), 3,63 (t, $J=6,40$ Гц, 2 H), 3,38-3,45 (m, 6 H), 2,72 (t, $J=6,65$ Гц, 2 H), 2,40 (t, $J=7,28$ Гц, 2 H), 1,55-1,75 (m, 8 H), 1,44 (s, 27 H). Масса, рассчитанная посредством спектрометрии: $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_8$: 530,36; измеренная масса: 531,3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Смесь соединения III (5,5 г, 10,3 ммоль) в HCl/диоксане (2 M, 55 мл) перемешивали при 25°C в течение 3 ч. Результаты LCMS демонстрировали полное израсходование соединения III. Реакционную смесь фильтровали, промывали с помощью EtOAc (50 мл) и высушивали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в CH_3CN (50 мл) и летучие вещества удаляли в вакууме. Процесс повторяли 3 раза с получением соединения IV (2,05 г, выход 54,5%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O): δ ppm 4,21 (s, 1 H), 4,07 (d, $J=4,5$ Гц, 4 H), 3,99 (s, 1 H), 3,45-3,52 (m, 3 H), 3,42 (t, $J=6,5$ Гц, 1 H), 3,32-3,38 (m, 1 H), 3,24-3,31 (m, 1 H), 2,37 (t, $J=7,4$ Гц, 1 H), 2,24 (t, $J=7,4$ Гц, 1 H), 1,99 (dt, $J=15,5, 7,53$ Гц, 1 H), 1,85-1,94 (m, 1 H), 1,85-1,94 (m, 1 H), 1,39-1,56 (m, 4 H), 1,19-1,31 (m, 2 H).

Смесь соединения IV (500 мг, 1,05 ммоль), промежуточного соединения A (2,02 г, 3,67 ммоль), DIEA (813 мг, 6,30 ммоль), EDCI (704 мг, 3,67 ммоль) и HOBT (496 мг, 3,67

ммоль) в DMF (10 мл) дегазировали и три раза продували с помощью N_2 , а затем смесь перемешивали при $25^\circ C$ в атмосфере N_2 в течение 3 ч. Результаты LCMS указывали на требуемый продукт. Реакционную смесь гасили путем добавления H_2O (10 мл) и экстрагировали с помощью DCM (10 мл \times 2). Объединенные органические вещества экстрагировали 10% лимонной кислотой (20 мл). Водную фазу подвергали нейтрализации насыщенным раствором $NaHCO_3$ и повторно экстрагировали с помощью DCM (10 мл \times 2). Органические вещества высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения Va (570 мг, 0,281 ммоль, выход 26,8%) в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР: (400 МГц, $CDCl_3$) ppm δ 7,84-8,12 (m, 3 H), 6,85-7,15 (m, 2 H), 6,66-6,81 (m, 1 H), 5,36 (br d, $J=2,7$ Гц, 3 H), 5,11-5,27 (m, 3 H), 4,63-4,85 (m, 3 H), 3,90-4,25 (m, 18 H), 3,37-3,75 (m, 28 H), 3,15-3,28 (m, 4 H), 2,64 (br d, $J=6,53$ Гц, 2 H), 2,30-2,46 (m, 2 H), 2,13-2,18 (m, 9 H), 2,05 (s, 9 H), 1,94-2,03 (m, 18 H), 1,68 (br s, 2 H), 1,45 (br s, 2 H), 1,12 (br t, $J=7,0$ Гц, 2 H).

Тетразолдиизопропиламмоний (30,3 мг, 0,177 ммоль) добавляли в раствор соединения Va (260 мг, 0,161 ммоль) в безводном DCM (5 мл), затем по каплям при температуре окружающей среды в атмосфере N_2 добавляли 3-бис(диизопропиламино)фосфорилпропионитрил (194 мг, 0,645 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при $20-25^\circ C$ в течение 2 ч. Результаты LCMS указывали на то, что соединение Va полностью израсходовалось. После охлаждения до $-20^\circ C$ реакционную смесь добавляли к перемешиваемому солевому раствору/насыщенному раствору $NaHCO_3$ (1: 1, 5 мл) при $0^\circ C$. После перемешивания в течение 1 минуты добавляли DCM (5 мл). Происходило расслоение. Органический слой промывали соевым раствором/насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (1:1, 5 мл), высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали до объема примерно 1 мл. Остаточный раствор по каплям добавляли к 20 мл метил-трет-бутилового эфира (МТБЕ) при перемешивании. Это приводило к осаждению белого твердого вещества. Смесь центрифугировали и собирали твердое вещество. Твердое вещество повторно растворяли в 1 мл DCM и осаждали путем добавления МТБЕ (20 мл). Твердое вещество снова отделяли путем центрифугирования. Собранное твердое вещество растворяли в безводном CH_3CN . Удаляли летучее вещество. Данный процесс повторяли еще дважды с получением фосфорамидитного соединения GLPA1 с GalNAc-содержащим лигандом (153 мг, 84,4 мкмоль) в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): ppm δ 7,71-8,06 (m, 2 H), 6,60-7,06 (m, 3 H), 5,37 (br d, $J=3,0$ Гц, 3 H), 5,18-5,32 (m, 3 H), 4,70-4,86 (m, 3 H), 3,92-4,25 (m, 18 H), 3,42-3,85 (m, 30 H), 3,25 (m, 4 H), 2,59-2,75 (m, 4 H), 2,27-2,44 (m, 2 H), 2,15-2,20 (s, 9 H) 2,07 (s, 9 H), 1,96-2,03 (m, 18 H), 1,65 (br s, 4 H), 1,44 (br d, $J=7,28$ Гц, 2 H), 1,14-1,24 (m, 12 H). ^{31}P ЯМР ($CDCl_3$): ppm δ 147,15.

Фосфорамидитное соединение GLPA2 с GalNAc-содержащим лигандом синтезировали с применением той же процедуры, за исключением применения промежуточного соединения В. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): ppm δ 7,94-8,18 (m, 1 H), 7,69 (br s, 1 H), 6,66-7,10 (m, 3 H), 5,35 (d, $J=3,5$ Гц, 3 H), 5,07-5,25 (m, 3 H), 4,76-4,86 (m, 3 H),

4,01-4,31 (m, 10 H), 3,91-4,01 (m, 8 H), 3,74-3,86 (m, 4 H), 3,52-3,71 (m, 30 H), 3,42-3,50 (m, 6 H), 3,15-3,25 (m, 4 H), 2,52-2,70 (m, 4 H), 2,22-2,45 (m, 2 H), 2,15-2,22 (s, 9 H), 2,06 (s, 9 H), 1,95-2,03 (m, 18 H), 1,77 (br s, 2 H), 1,58-1,66 (m, 4 H), 1,40 (m, 2 H), 1,08-1,24 (m, 12 H).
 ^{31}P ЯМР (CDCl_3): ppm δ 147,12.

GLPA15 получали согласно приведенной ниже схеме 3.

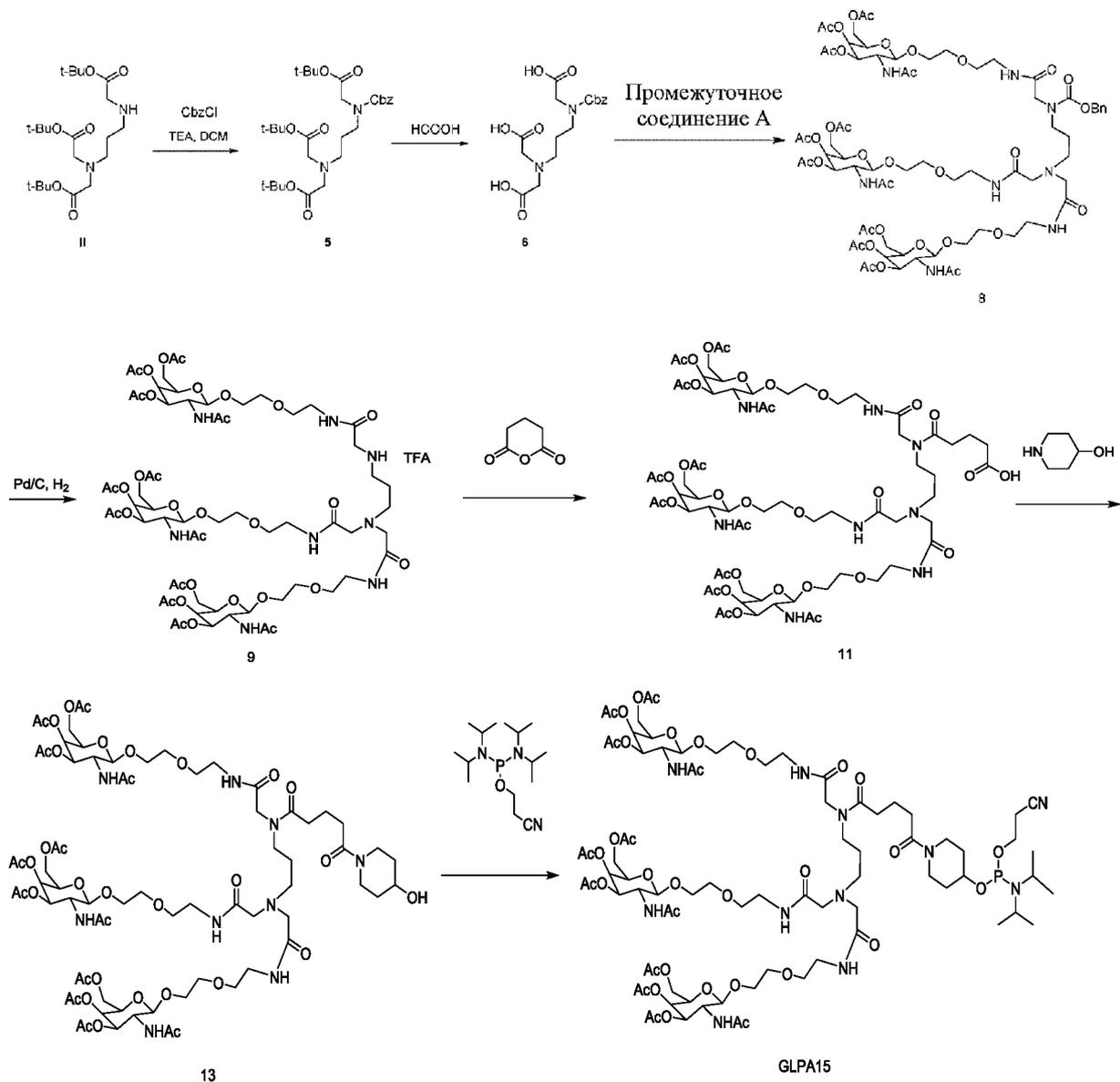


Схема 3

В раствор промежуточного соединения II (275 г, 660 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (2,75 л) добавляли триэтиламин (133 г, 1,32 моль, 2,00 экв.), затем по каплям добавляли Cbz-Cl (169 г, 990 ммоль, 1,50 экв.). Реакционную жидкость перемешивали при 25°C в течение 2 ч, и результаты LCMS демонстрировали полное превращение соединения II. Реакционную жидкость последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (800 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (500 мл) и органическую фазу высушивали над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации с удалением осушителя фильтрат концентрировали до сухого состояния. Остаток подвергали колоночной хроматографии (SiO_2 , PE/EA=от 100/1 до 5/1) с

получением соединения **5** (290 г, 527 ммоль, выход 75,7%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц in DMSO- d_6): δ ppm 7,23-7,40 (m, 5 H), 5,00-5,12 (m, 2 H), 3,86-3,95 (m, 2 H), 3,23-3,39 (m, 6 H), 2,55-2,67 (m, 2 H), 1,56-1,64 (m, 2 H), 1,31-1,46 (m, 27 H). MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: **551,6**.

НСООН (2,9 л) добавляли к соединению **5** (145 г, 263 ммоль, 1,00 экв.) и раствор перемешивали при 60°C в течение 12 ч. Результаты LCMS демонстрировали полное превращение соединения **5**. В реакционную жидкость добавляли 1,5 л толуола и 1,5 л ацетонитрила и смесь концентрировали при пониженном давлении до приблизительно 500 мл. Затем добавляли толуол/ацетонитрил (1:1, приблизительно 750 мл) и смесь концентрировали до приблизительно 500 мл. Затем добавляли ацетонитрил (приблизительно 1000 мл) и смесь концентрировали до сухого состояния. Неочищенный продукт измельчали с 700 мл ацетонитрила при 60°C в течение 2 ч и фильтровали. Твердое вещество собирали и высушивали с получением белого твердого соединения **6** (105 г, количественная оценка). ^1H ЯМР (400 МГц in DMSO- d_6): δ ppm 7,26-7,40 (m, 5 H), 5,02-5,10 (m, 2 H), 3,89-4,00 (m, 2 H), 3,36-3,45 (m, 4 H), 3,24-3,34 (m, 2 H), 2,59-2,72 (m, 2 H), 1,40 (s, 2 H). MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: **383,0**.

ТВТУ (327 г, 1,02 моль, 3,90 экв.) и триэтиламин (212 г, 2,09 моль, 8,00 экв.) добавляли в раствор соединения **6** (100 г, 261 ммоль) и промежуточного соединения А (502 г, 915 ммоль, 3,50 экв.) в DMF (1,0 л) и проводили реакцию при 25°C в течение 1 ч. Результаты LCMS демонстрировали, что превращение соединения **6** завершилось. Реакционную жидкость добавляли в 4000 мл воды и экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром (2000 мл, двумя порциями) с удалением примесей, а оставшуюся водную фазу экстрагировали дихлорметаном (3000 мл, двумя порциями). Дихлорметановую фазу последовательно промывали 10% водным раствором лимонной кислоты (2000 мл, двумя порциями), насыщенным раствором NaHCO_3 (2,0 л, двумя порциями) и насыщенным солевым раствором (2,0 л) и высушивали над безводным Na_2SO_4 . Фильтрат фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения **8** (260 г, 159 ммоль, выход 60,9%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц in DMSO- d_6): δ ppm 7,99-8,08 (m, 2 H), 7,93 (br d, $J=5,50$ Гц, 1 H), 7,79-7,86 (m, 3 H), 7,26-7,39 (m, 5 H), 5,22 (d, $J=3,13$ Гц, 3 H), 4,95-5,08 (m, 5 H), 4,54 (br d, $J=8,38$ Гц, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,81-3,93 (m, 5 H), 3,76 (br d, $J=4,88$ Гц, 3 H), 3,44-3,62 (m, 10 H), 3,34-3,43 (m, 6 H), 3,24 (br d, $J=6,13$ Гц, 7 H), 3,02-3,09 (m, 4 H), 2,40-2,47 (m, 2 H), 2,10 (s, 9 H), 1,99 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,77 (s, 9 H), 1,57-1,68 (m, 2 H). MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: **816,4**.

Автоклав для гидрогенизации объемом 2 л инертизировали аргоном и осторожно добавляли сухой Pd/C (9 г). Для смачивания Pd/C добавляли MeOH (50 мл), а затем медленно в атмосфере аргона добавляли раствор соединения **8** (90 г, 55,1 ммоль, 1,00 экв.) и трифторуксусной кислоты (6,29 г, 55,1 ммоль, 1,00 экв.) в MeOH (850 мл). Смесь дегазировали/три раза подвергали замене H_2 в атмосфере водорода и перемешивали при 25°C в течение 10 ч. Результаты LCMS демонстрировали полное превращение соединения

8. Удаляли Pd/C путем фильтрации и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения **9** (80 г, выход 90,2%). ^1H ЯМР (400 МГц in DMSO- d_6): δ ppm 9,12 (br s, 2 H), 8,50 (br t, $J=5,19$ Гц, 1 H), 8,10 (br t, $J=5,50$ Гц, 2 H), 7,85-7,91 (m, 3 H), 5,22 (d, $J=3,25$ Гц, 3 H), 4,95-5,01 (m, 3 H), 4,52-4,58 (m, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,84-3,93 (m, 3 H), 3,75-3,83 (m, 3 H), 3,39-3,61 (m, 16 H), 3,23-3,32 (m, 6 H), 3,15-3,18 (m, 3 H), 2,97-3,05 (m, 2 H), 2,54-2,61 (m, 2 H), 2,10 (s, 9 H), 2,00 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,77-1,80 (m, 9 H), 1,70-1,76 (m, 2 H). MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: **749,3**.

Добавляли триэтиламин (67,8 г, 672 ммоль, 4,00 экв.) в раствор соединения **9** (270 г, 168 ммоль, 1,00 экв.) и глутарового ангидрида (28,6 г, 252 ммоль, 1,50 экв.) в дихлорметане (2,7 л). Раствор перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Результаты LCMS демонстрировали, что соединение **9** полностью превратилось в соединение **11**. В реакционную жидкость добавляли 4-гидроксипиперидин (42,4 г, 420 ммоль, 2,50 экв.) и ТВТУ (107 г, 335 ммоль, 2,00 экв.) и продолжали перемешивание при 25°C в течение 1 ч. Результаты LCMS демонстрировали, что превращение соединения **11** завершилось. Реакцию гасили путем медленного добавления насыщенного раствора NH_4Cl (3,0 л), слои разделяли и водную фазу экстрагировали дихлорметаном (2 x 1000 мл) и объединяли с предыдущей органической фазой. Объединенные органические фазы промывали смесью насыщенного раствора NaHCO_3 (водн.) и насыщенного солевого раствора (3,0 л) в соотношении 1:1, высушивали над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт растворяли в 1,5 л дихлорметана и полученный раствор по каплям добавляли в метил-трет-бутиловый эфир (7,5 л). Во время добавления постепенно образовывался полупрозрачный белый осадок. Осадок фильтровали в вакууме и твердое вещество собирали и высушивали в вакууме с получением соединения **13** (207 г, выход 72,8%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц in DMSO- d_6): δ ppm 8,05 (br d, $J=2,00$ Гц, 2 H), 7,82 (br d, $J=7,38$ Гц, 3 H), 5,21 (br s, 3 H), 4,98 (br d, $J=10,26$ Гц, 3 H), 4,72 (br s, 1 H), 4,54 (br d, $J=7,88$ Гц, 3 H), 4,03 (br s, 9 H), 3,74-3,94 (m, 9 H), 3,45-3,71 (m, 12 H), 3,40 (br s, 6 H), 3,24 (br s, 7 H), 3,07 (br d, $J=14,13$ Гц, 5 H), 2,91-3,01 (m, 1 H), 2,24-2,44 (m, 5 H), 2,20 (br s, 1 H), 2,10 (s, 9 H), 1,96-2,04 (m, 9 H), 1,89 (br s, 9 H), 1,74-1,81 (m, 9 H), 1,51-1,73 (m, 6 H), 1,07-1,36 (m, 3 H). MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: 848,0.

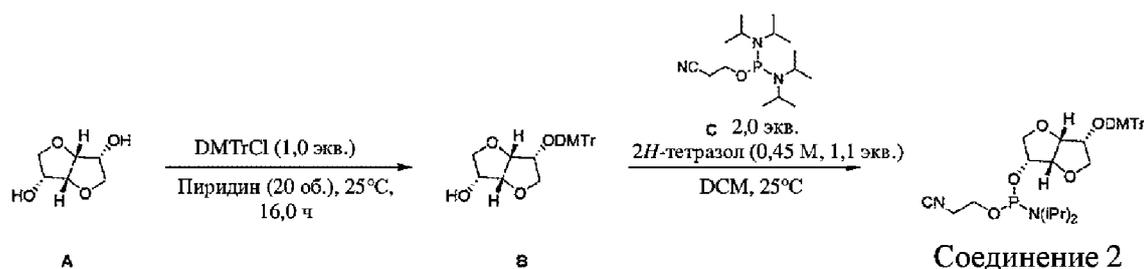
3-Бис(диизопропиламино)фосфонилоксипропионитрил (53,3 г, 177 ммоль, 1,50 экв.) добавляли в раствор соединения **13** (200 г, 118 ммоль, 1,00 экв.) и тетразолдиизопропиламмония (8,08 г, 47,2 ммоль, 0,40 экв.) в дихлорметане (2,0 л) и реакционную жидкость перемешивали при 40°C в течение 2 ч. Результаты LCMS демонстрировали, что превращение соединения **13** завершилось. Реакционную жидкость промывали смесью насыщенного раствора NaHCO_3 и насыщенного водного раствора хлорида натрия (2,0 л) в соотношении 1:1, высушивали над безводным Na_2SO_4 , и фильтрат концентрировали, и полученный неочищенный продукт растворяли в дихлорметане (1,2 л), и полученный раствор по каплям добавляли в перемешиваемый метил-трет-бутиловый эфир (6,0 л). Суспензию фильтровали, осадок на фильтре ополаскивали метил-трет-

бутиловым эфиром, твердое вещество собирали и высушивали в вакууме, продукт растворяли в дихлорметане (1,0 л) и концентрировали до сухого состояния и данную операцию повторяли 4 раза для удаления остаточного трет-бутилового эфира с получением GLPA15 (164 г, выход 73,3%). ^1H ЯМР (400 МГц in DMSO-d₆): δ ppm 8,05 (br d, $J=6,50$ Гц, 2 H), 7,81 (br d, $J=9,01$ Гц, 3 H), 5,22 (d, $J=3,25$ Гц, 3 H), 4,98 (dd, $J=11,26, 3,25$ Гц, 3 H), 4,55 (br d, $J=8,50$ Гц, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,64-3,97 (m, 12 H), 3,55-3,63 (m, 6 H), 3,50 (br s, 5 H), 3,40 (br d, $J=6,13$ Гц, 6 H), 3,17-3,30 (m, 9 H), 3,07 (br d, $J=14,26$ Гц, 4 H), 2,76 (t, $J=5,82$ Гц, 2 H), 2,18-2,47 (m, 6 H), 2,10 (s, 9 H), 1,99 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,78 (s, 9 H), 1,52-1,74 (m, 6 H), 1,12-1,19 (m, 12 H). ^{31}P ЯМР (DMSO-d₆): ppm δ 145,25. MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ масса/заряд: 1895,7.

В определенных исследованиях предложены способы связывания нацеливающей группы, содержащей GalNAc (в данном документе также называемой соединением для доставки, содержащим GalNAc), с 5'-концом смысловой нити, включающие применение фосфорамидита GalNAc (GLPA1) на последней стадии сочетания твердофазного синтеза и применение такого способа синтеза, как способ синтеза, который применяют во время удлинения нити олигонуклеотида (т. е. добавления нуклеотидов на 5'-конце смысловой нити) для связывания GLPA1 с 5'-концом смысловой нити.

В некоторых исследованиях способы связывания GalNAc-содержащих нацеливающих групп с 3'-концом смысловой нити включают применение твердой подложки (CPG), содержащей GLO-н. В некоторых исследованиях способ связывания нацеливающей группы, содержащей GalNAc, с 3'-концом смысловой нити включает связывание GalNAc-содержащей нацеливающей группы с твердой подложкой CPG посредством сложноэфирной связи и применение полученной CPG со связанной GalNAc-содержащей нацеливающей группой при синтезе смысловой нити, в результате чего GalNAc-содержащая нацеливающая группа связывается с 3'-концом смысловой нити. Другие GalNAc-содержащие фосфорамидитные соединения (GLPAn) также могут быть получены с применением приемлемого соответствующего промежуточного соединения и с применением способа, подобного описанному в данном документе или известного из уровня техники, и они могут быть связаны с подходящим положением дуплекса siRNA в качестве нацеливающей группы.

Пример 4. Синтез фосфорамидита изоманнита (соединение 2)



В раствор соединения А (изоманнит, 100 г, 684 ммоль, 1,0 экв.) в пиридине (600 мл) добавляли хлорид 4,4'-диметокситрифенилметана (DMTrCl, 232 г, 684 ммоль, 1,0 экв.)

в пиридине (400 мл) и смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Результаты LC-MS демонстрировали, что соединение А полностью израсходовалось, и был выявлен основной пик требуемой массы. Полученную реакционную смесь разбавляли водой (500 мл), экстрагировали дихлорметаном (500 мл * 2), объединенные органические фазы промывали солевым раствором (500 мл), высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме с получением остатка. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (DCM/MeOH=от 100/1 до 50/1, 0,1% Et₃N) с получением соединения В (150 г, выход 48,9%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР: EC4783-404-P1B1_C (400 МГц, DMSO-d₆)

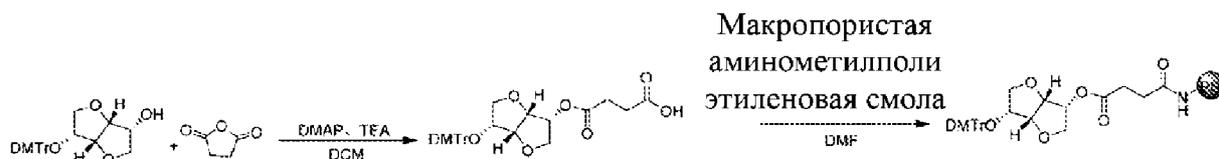
δ ppm 7,46 (br d, $J=7,63$ Гц, 2 H) 7,28-7,37 (m, 6 H) 7,19-7,25 (m, 1 H) 6,90 (br d, $J=7,88$ Гц, 4 H) 4,70 (d, $J=6,50$ Гц, 1 H) 3,99-4,09 (m, 6 H) 3,88-3,96 (m, 2 H) 3,83 (br dd, $J=7,82, 6,94$ Гц, 1 H) 3,74 (s, 6 H) 3,41 (br t, $J=8,13$ Гц, 1 H) 3,05 (t, $J=8,44$ Гц, 1 H) 2,85 (br t, $J=7,50$ Гц, 1 H).

2Н-тетразол (0,45 М, 436 мл, 1,1 экв.) по каплям добавляли в раствор соединения В (80,0 г, 178 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (5,0 мл) при 25°C в атмосфере N₂, а затем по каплям добавляли раствор соединения С (2-цианоэтилдиизопропилхлорфосфорамидит, 80,6 г, 267 ммоль, 85,0 мл, 1,5 экв.) в дихлорметане (200 мл); реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,0 ч; результаты LC-MS демонстрировали, что соединение В полностью израсходовалось, и был выявлен основной пик с требуемой массой. Полученную реакционную смесь охлаждали до -20°C, выливали в ледяной NaHCO₃ (500 мл), экстрагировали дихлорметаном (500 мл * 3) и объединенные органические слои промывали смесью NaHCO₃/солевой раствор=1: 1 (300 мл/300 мл), высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме (35°C) с получением остатка (100 мл). Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (Al₂O₃, DCM/MeOH= от 100/1 до 50/1, 0,1% Et₃N) с получением соединения 2, представляющего собой фосфорамидит изоманнита (77 г, 119 ммоль, выход: 66,5%), в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР: EC4783-423-P1B1_C (400 МГц, DMSO-d₆)

δ ppm 7,22 (br d, $J=7,50$ Гц, 2 H) 7,05-7,14 (m, 6 H) 6,96-7,02 (m, 1 H) 6,67 (br dd, $J=8,82, 1,81$ Гц, 4 H) 3,95-4,07 (m, 2 H) 3,73-3,83 (m, 1 H) 3,62-3,72 (m, 2 H) 3,48-3,53 (m, 6 H) 3,27-3,37 (m, 3 H) 3,11 (s, 6 H) 2,82 (td, $J=8,54, 2,31$ Гц, 1 H) 2,47-2,63 (m, 3 H) 2,28 (br d, $J=1,63$ Гц, 3 H) 0,82-1,00 (m, 13 H).

Пример 5. Получение твердой подложки, содержащей мономер изоманнита



представляет собой фрагмент подложки из макропористой

аминометилполиэтиленовой смолы.

Стеклянный котел объемом 50 л помещали под защиту азота, в стеклянный котел добавляли дихлорметан (19,50 кг) и начинали перемешивание. Температуру контролировали на уровне 20-30°C, в стеклянный котел добавляли DMTr-изоманн. (1,47 кг), в реакционный котел добавляли триэтиламин (1,50 кг), 4-диметиламинопиридин (0,164 кг) и янтарный ангидрид (1,34 кг). Систему выдерживали в тепле при 20-30°C в течение 18 ч, а затем отбирали образцы и реакцию прекращали. В реакционную систему добавляли насыщенный раствор бикарбоната натрия (22,50 кг), перемешивали в течение 10-20 мин и затем выдерживали до расслаивания, переносили органическую фазу в нижнем слое и водную фазу в верхнем слое дважды экстрагировали дихлорметаном; органические фазы объединяли и высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтрат фильтровали и затем переносили для роторного испарения и концентрировали до отсутствия фракций с образованием 1,83 кг твердого вещества квазибелого цвета.

N, N-диметилформамид (23,50 кг) добавляли в стеклянный котел объемом 100 л и перемешивали. Температуру контролировали на уровне 20-30°C. Под защитой азота полученный на предыдущей стадии продукт, гексафторфосфат O-бензотриазолтетраметилурония (0,33 кг), и N, N-диизопропилэтиламин (0,13 кг) добавляли в стеклянный котел объемом 100 л через воронку для подачи твердых веществ. После завершения добавления смесь перемешивали в течение 10-30 мин и затем выгружали в оцинкованное ведро объемом 50 л для резервного применения. Макропористую аминометильную смолу (3,25 кг) (доступную от Tianjin Nankai Hecheng Technology Co., Ltd., номер партии HA2X1209, емкость загрузки 0,48 ммоль/г) добавляли в вышеупомянутый котел объемом 100 л для твердофазного синтеза через воронку для подачи твердых веществ, температуру контролировали на уровне 20-30°C, в котел для твердофазного синтеза добавляли N, N-диметилформамид (21,00 кг+21,00 кг) и реакционную жидкость для применения в оцинкованном ведре на предыдущей стадии. В системе проводили реакцию в условиях контролируемой температуры, осуществляли мониторинг до достижения загрузки твердым веществом ≥ 250 мкмоль/г, и способ определения загрузки представлял собой UV. Систему подвергали фильтрованию под давлением в атмосфере азота, и осадок на фильтре три раза промывали N, N-диметилформамидом (26,00 кг+26,10 кг+26,00 кг), и осадок на фильтре оставался в котле. CAP.A (4,40 кг+4,42 кг+4,30 кг) и CAP.B (4,40 кг+4,40 кг+4,47 кг) добавляли в стеклянный котел объемом 80 л и перемешивали в течение 3-8 мин. Данную операцию повторяли 3 раза для кэпирования. В котел для твердофазного синтеза добавляли ацетонитрил (18,00 кг+18,00 кг+18,00 кг+17,50 кг+17,50 кг). Перед фильтрованием под давлением в течение 10-30 мин барботировали азотом. Данную операцию повторяли четыре раза. Осадок на фильтре продували азотом в котле для твердофазного синтеза в течение 2-4 ч и затем переносили в резервуар объемом 50 л с фильтр-прессом. Температуру контролировали на уровне 15-30°C и продолжали высушивание. После высушивания взвешивали твердый продукт с цветом от желтого до белого: 3,516 кг.

К 5'-концу или 3'-концу нити олигонуклеотида могли быть добавлены остатки изосорбида (изоманн.) посредством способа, хорошо известного специалистам в данной области техники, такого как способ добавления обратного нуклеотида без основания (invab), и дополнительно добавляли нацеливающую группу.

Пример 6. Скрининг *in vitro* дуплексов siRNA LPA с применением клеток Huh7 и вектора с двумя флуоресцентными репортерными генами.

Клетки Huh7 доводили до соответствующей плотности и затем высевали в 96-луночные планшеты. Согласно рекомендациям производителя, одновременно с инокуляцией вектором psciCHECK2 с двумя флуоресцентными репортерными генами, содержащим целевой ген, совместно с siRNA трансфицировали клетки Huh7 с применением Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen-13778-150). Клетки трансфицировали тестируемыми siRNA или контрольными siRNA. SiRNA тестировали в трех повторностях в двух концентрациях (0,1 нМ и 1,0 нМ) и через 48 ч после трансфекции добавляли реагент для люциферазного анализа Dual-Glo® для определения значений флуоресценции. Соотношение люминесценции люциферазы *Renilla* и люминесценции люциферазы светлячка рассчитывали и подвергали нормализации на основании соотношения контрольных образцов, обработанных с помощью siRNA, для расчета эффективности нокдауна. В результате, как показано в таблице 4, применяемый дуплекс AV№ получают из последовательности, соответствующей последовательности, показанной в таблице 2.

В таблице 4 представлены экспериментальные результаты исследований *in vitro* подавления экспрессии LPA с применением множества средств для RNAi LPA.

ID соединения	% подавления						Среднее значение ± SD	
	1 нМ			0,1 нМ			1 нМ	0,1 нМ
AV00122	46,88	39,56	29,62	-10,77	-1,49	-18,62	38,69± 8,66	-10,29± 8,57
AV00123	42,34	26,55	36,79	-7,68	-31,59	-10,12	35,23± 8,01	-16,46± 13,16
AV00124	62,09	60,30	65,01	23,45	32,98	27,50	62,47± 2,38	27,98± 4,78
AV00125	25,96	19,54	13,62	10,87	5,64	8,35	19,71± 6,17	8,28± 2,62
AV00126	57,79	49,37	49,63	24,96	28,22	13,57	52,26± 4,79	22,25± 7,69
AV00127	60,31	51,67	54,57	22,52	12,95	13,87	55,52± 4,4	16,44± 5,28
AV00128	14,45	19,71	8,00	14,39	2,08	-5,46	14,05±	3,67±

							5,87	10,02
AV00129	37,12	38,30	20,18	26,01	12,46	-1,20	31,87± 10,14	12,42± 13,61
AV00130	5,18	5,32	10,82	21,04	18,38	13,33	7,11± 3,22	17,58± 3,92
AV00131	30,07	31,44	38,14	8,51	25,97	23,80	33,22± 4,32	19,43± 9,51
AV00132	26,46	16,87	24,53	26,67	-5,93	18,47	22,62± 5,07	13,07± 16,96
AV00133	30,64	13,58	30,46	1,27	16,57	14,84	24,9± 9,8	10,89± 8,38
AV00134	-1,69	23,47	3,75	-10,06	-11,46	2,31	8,51± 13,24	-6,4± 7,58
AV00135	-0,25	15,11	11,55	-0,35	-1,05	-10,59	8,8± 8,04	-4± 5,72
AV00136	-5,77	2,13	5,80	10,89	14,96	2,82	0,72± 5,91	9,56± 6,18
AV00137	19,35	21,06	29,49	15,89	13,70	10,16	23,3± 5,43	13,25± 2,89
AV00138	48,10	46,49	44,67	19,50	13,68	19,53	46,42± 1,71	17,57± 3,37
AV00139	61,67	63,90	49,21	26,21	27,72	25,37	58,26± 7,92	26,44± 1,19
AV00140	34,63	29,60	28,49	16,87	25,81	23,73	30,91± 3,27	22,14± 4,68
AV00141	37,26	40,08	34,19	24,02	10,49	7,39	37,17± 2,95	13,96± 8,84
AV00142	31,56	38,44	47,32	32,86	30,04	7,52	39,11± 7,9	23,47± 13,89
AV00143	16,55	5,61	25,08	2,56	1,09	14,66	15,75± 9,76	6,1± 7,44
AV00144	34,87	36,47	22,09	-1,37	23,23	-2,57	31,14± 7,88	6,43± 14,56
AV00145	12,58	20,84	23,93	6,89	17,73	18,90	19,12±	14,51±

							5,87	6,62
AV00146	17,23	2,18	35,70	9,75	-14,56	9,86	18,37± 16,79	1,68± 14,07
AV00147	37,07	29,40	30,89	-12,86	12,78	3,28	32,46± 4,07	1,07± 12,96
AV00148	18,91	24,27	20,66	15,39	-0,29	10,06	21,28± 2,74	8,38± 7,97
AV00149	34,67	35,51	42,00	17,63	14,16	0,91	37,39± 4,01	10,9± 8,83
AV00150	23,64	32,49	39,08	8,26	27,22	4,10	31,74± 7,75	13,2± 12,32
AV00151	29,63	18,23	33,40	-11,53	4,85	3,28	27,08± 7,9	-1,14± 9,04
AV00152	7,14	8,73	11,52	-10,32	7,00	19,93	9,13± 2,22	5,54± 15,18
AV00153	15,18	17,10	11,01	-2,68	18,17	8,92	14,43± 3,11	8,14± 10,45
AV00154	3,76	8,40	-2,82	3,55	11,84	23,76	3,11± 5,64	13,05± 10,16
AV00155	40,39	35,99	24,94	20,29	4,72	8,22	33,78± 7,96	11,08± 8,17
AV00156	48,03	53,87	44,46	19,65	4,24	0,54	48,79± 4,75	8,14± 10,14
AV00157	5,83	0,73	14,54	8,81	0,28	-5,20	7,03± 6,98	1,29± 7,06
AV00158	-25,20	-13,67	-10,50	-19,74	-27,38	-8,06	-16,46± 7,74	-18,39± 9,73
AV00159	-0,49	-1,23	3,57	12,19	7,24	-8,92	0,62± 2,59	3,5± 11,04
AV00160	-14,61	-0,51	-16,26	-13,95	4,74	-36,43	-10,46± 8,65	-15,21± 20,61
AV00161	37,16	23,76	20,23	0,03	3,95	4,53	27,05± 8,94	2,84± 2,45
AV00162	15,17	30,06	26,53	1,97	4,32	9,94	23,92±	5,41±

							7,78	4,1
AV00163	26,51	6,32	4,45	3,68	-6,42	-0,56	12,43± 12,23	-1,1± 5,08
AV00164	12,92	3,15	0,52	4,68	-0,72	-5,31	5,53± 6,54	-0,45±5
AV00165	8,82	27,01	-8,40	6,07	-1,25	-4,54	9,14± 17,71	0,09± 5,43
AV00166	-0,92	-11,91	4,33	-1,21	5,41	7,70	-2,83± 8,29	3,97± 4,63
AV00167	38,80	26,25	13,39	16,98	9,31	1,68	26,14± 12,7	9,32± 7,65
AV00168	50,66	44,21	42,59	-3,68	18,09	24,86	45,82± 4,27	13,09± 14,91
AV00169	-4,71	1,84	-6,06	-7,67	0,35	-1,47	-2,97± 4,23	-2,93± 4,2
AV00170	-26,60	-24,07	-18,79	-25,70	8,71	12,90	-23,15± 3,98	-1,36± 21,18
AV00171	-9,86	0,81	8,35	-18,50	-8,10	-28,33	-0,23± 9,15	-18,31± 10,11
AV00172	21,83	29,14	21,85	14,74	8,44	-2,30	24,28± 4,21	6,96± 8,62
AV00173	18,80	11,14	9,85	0,53	4,28	2,49	13,26± 4,84	2,44± 1,87
AV00174	20,20	3,18	27,08	0,74	11,08	-3,33	16,82± 12,3	2,83± 7,43
AV00175	17,95	12,15	13,36	12,15	17,57	-0,95	14,49± 3,06	9,59± 9,52
AV00176	44,25	48,81	43,11	7,78	25,40	20,96	45,39± 3,02	18,05± 9,16
AV00177	23,93	36,34	27,92	23,12	-5,39	9,75	29,4± 6,34	9,16± 14,26
AV00178	0,00	6,42	-9,82	9,86	18,29	4,30	-1,13± 8,18	10,82± 7,04
AV00179	10,09	0,83	15,90	17,67	0,27	-3,09	8,94±	4,95±

							7,6	11,15
AV00180	23,19	31,99	32,14	1,35	-1,15	10,37	29,11± 5,12	3,52± 6,06
AV00181	-2,78	-11,51	-6,05	3,14	3,68	17,42	-6,78± 4,41	8,08± 8,1
AV00182	-42,00	-13,22	-16,52	-18,26	-6,23	-5,03	-23,91± 15,75	-9,84± 7,32
AV00183	-6,80	7,22	-13,19	-5,60	-3,55	-10,33	-4,26± 10,44	-6,49± 3,48
AV00184	-19,87	-3,42	2,48	-11,82	5,71	-5,44	-6,93± 11,58	-3,85± 8,87
AV00185	7,87	12,20	6,68	7,79	20,31	8,12	8,92± 2,91	12,07± 7,14
AV00186	16,29	14,22	8,71	4,34	1,60	19,64	13,07± 3,92	8,53± 9,72
AV00187	27,62	23,09	32,62	-0,06	-7,08	-2,73	27,78± 4,77	-3,29± 3,55
AV00188	25,32	11,82	9,96	6,89	2,45	5,45	15,7± 8,39	4,93± 2,26
AV00189	36,90	25,16	27,89	9,72	26,25	13,84	29,98± 6,14	16,6± 8,61
AV00190	-19,33	-3,61	17,31	2,40	13,23	6,97	-1,88± 18,38	7,53± 5,44
AV00191	-8,17	2,85	-14,56	7,21	6,42	4,45	-6,63± 8,81	6,03± 1,42
AV00192	-15,69	7,96	7,26	5,66	16,15	10,03	-0,16± 13,46	10,61± 5,27
AV00193	-4,92	15,62	-2,27	2,99	-3,76	3,73	2,81± 11,17	0,98± 4,13
AV00194	-33,87	-19,43	-28,60	-43,88	-20,84	-7,36	-27,3± 7,31	-24,03± 18,47
AV00195	0,20	18,94	13,75	-12,53	-16,30	-4,18	10,96± 9,68	-11± 6,21
AV00196	13,36	2,83	9,10	-11,87	1,83	-11,47	8,43±	-7,17±

							5,3	7,8
AV00197	16,31	10,80	17,97	15,72	3,62	-12,32	15,03± 3,75	2,34± 14,07
AV00198	9,66	-9,58	13,15	11,57	25,56	9,67	4,41± 12,24	15,6± 8,67
AV00199	1,16	4,54	7,07	18,16	-2,74	13,05	4,26± 2,97	9,49± 10,9
AV00200	0,38	17,21	5,05	11,62	-19,20	-21,34	7,55± 8,69	-9,64± 18,44
AV00201	13,46	3,72	-1,04	-2,48	-6,79	13,82	5,38± 7,39	1,51± 10,87
AV00202	17,81	27,79	23,96	24,33	16,06	14,70	23,19± 5,04	18,36± 5,22
AV00203	23,36	24,72	14,70	12,28	0,46	11,09	20,93± 5,44	7,94± 6,51
AV00204	9,50	27,29	11,48	-0,63	11,79	-7,73	16,09± 9,75	1,14± 9,88
AV00205	5,30	6,46	11,40	-3,32	4,30	-15,98	7,72± 3,24	-5± 10,24

Пример 7. Тестирование дуплекса siRNA LPA *in vivo*

Для оценки активности siRNA LPA *in vivo* применяли мышей, инфицированных AAV, кодирующим LPA человека и ген люциферазы (4 мыши на группу). Самок мышей C57BL/6J инфицировали за 14 дней до введения siRNA путем внутривенной инъекции исходного раствора 2×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего LPA человека и ген люциферазы. В день 0 мышам путем подкожной инъекции вводили однократную дозу 6 мг/кг средства на основе siRNA LPA или PBS. Собирали образцы крови в день 0, перед введением siRNA и в конце дня 7. Измеряли люциферазную активность. Процент нокдауна рассчитывали путем сравнения люциферазной активности в образцах крови из группы, обработанной с помощью siRNA, перед введением и люциферазной активности в образцах крови, собранных в конце дня 7, и проведения нормализации на основании изменений люциферазной активности в образцах сыворотки крови, полученных от группы, обработанной с помощью PBS. В результате, как показано в таблице 5, применяемый дуплекс AD№ получают из последовательности, соответствующей последовательности, показанной в таблице 3.

В таблице 5 приведены экспериментальные результаты исследований *in vivo* ингибирующего эффекта в отношении экспрессии LPA с применением множества средств для RNAi LPA_ в однократной дозе 6 мг/кг. В день 7 оставшуюся люциферазную

активность относительно дня 0 подвергали нормализации относительно изменения в группе, обработанной с помощью PBS (среднее значение \pm SD).

AD№ дуплекса	День 7, люциферазная активность относительно PBS (среднее значение \pm SD)
AD00433	0,71 \pm 0,23
AD00434	0,66 \pm 0,33
AD00438	0,69 \pm 0,22
AD00436	0,22 \pm 0,07
AD00441	0,54 \pm 0,08

Пример 8. Тестирование дуплекса siRNA LPA *in vivo*

Для оценки активности siRNA LPA *in vivo* применяли мышей, инфицированных AAV, кодирующим LPA человека и ген люциферазы (4 мыши на группу). Самок мышей C57BL/6J инфицировали за 14 дней до введения siRNA путем внутривенной инъекции исходного раствора 2×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего LPA человека и ген люциферазы. В день 0 мышам путем подкожной инъекции вводили однократную дозу 6 мг/кг средства на основе siRNA LPA или PBS. Образцы крови собирали перед введением siRNA в день 0, в конце дня 7 и дня 14. Измеряли люциферазную активность и процент нокдауна рассчитывали путем сравнения люциферазной активности в образцах крови из группы, обработанной с помощью siRNA, перед введением и люциферазной активности в образцах крови, собранных в день 7 и день 14, и проведения нормализации на основании изменений люциферазной активности в образцах сыворотки крови, полученных от группы, обработанной с помощью PBS. Сравнивали процент нокдауна (удержания) уровней mRNA LPA человека (определяли посредством qPCR) в печени мышей в день 14 между группой, обработанной с помощью siRNA, и группой, обработанной с помощью PBS, и результаты показаны в таблице 6. Применяемый дуплекс AD№ получали из последовательностей, соответствующих последовательностям, показанным в таблице 3.

В таблице 6 приведены экспериментальные результаты исследований *in vivo* подавления экспрессии LPA с применением множества средств для RNAi_LPA в однократной дозе 6 мг/кг.

AD№ дуплекса	День 7, люциферазная активность относительно PBS (среднее значение \pm SD)	День 14, люциферазная активность относительно PBS (среднее значение \pm SD)	Процент mRNA LPA человека, сохранившейся в печени мышей, определяли посредством qPCR (среднее значение \pm SD).
AD00474	0,36 \pm 0,05	0,31 \pm 0,18	0,36 \pm 0,24

AD00475	0,53±0,56	0,36±0,27	0,14±0,1
AD00476	0,73±0,46	0,38±0,1	0,17±0,08
AD00477	1,11±0,3	0,64±0,14	0,82±0,14
AD00478	0,73±0,39	0,61±0,17	0,38±0,31
AD00479	0,48±0,26	0,48±0,07	0,18±0,11
AD00480	0,31±0,18	0,22±0,14	0,14±0,12
AD00481	0,93±0,35	0,72±0,32	0,57±0,12
AD00482	0,47±0,37	0,4±0,33	0,15±0,08
AD00474-1	0,48±0,1	0,3±0,1	0,33±0,4
AD00478-1	0,48±0,09	0,32±0,05	0,32±0,1
AD00482-1	0,4±0,1	0,34±0,07	0,18±0,13
AD00483	0,49±0,16	0,6±0,21	0,65±0,4
AD00484	0,83±0,11	1,08±0,35	0,77±0,32
AD00485	0,41±0,09	0,54±0,14	0,49±0,16
AD00486	0,4±0,19	0,69±0,09	NA
AD00487	0,44±0,11	0,83±0,18	NA
AD00484-1	0,51±0,16	0,64±0,35	0,45±0,49
AD00342	0,6±0,18	0,58±0,13	0,59±0,21

NA означает, что значение не было выявлено.

Пример 9. Тестирование дуплекса siRNA LPA *in vivo*

Для оценки активности siRNA LPA *in vivo* применяли мышей, инфицированных AAV, кодирующим LPA человека и ген люциферазы (4 мыши на группу). Самок мышей C57BL/6J инфицировали за 7 дней до введения siRNA путем внутривенной инъекции исходного раствора 2×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего LPA человека и ген люциферазы. В день 0 мышам путем подкожной инъекции вводили однократную дозу 3 мг/кг, 6 мг/кг и 10 мг/кг средства на основе siRNA LPA или PBS соответственно. Мышей умерщвляли в момент прекращения эксперимента. Сравнивали процент нокдауна (удержания) уровней mRNA LPA человека (определяли посредством qPCR) в печени мышей в день 14 между группой, обработанной с помощью siRNA, и группой, обработанной с помощью PBS, и результаты показаны в таблице 7. Применяемый дуплекс AD№ получали из последовательностей, соответствующих последовательностям, показанным в таблице 3.

В таблице 7 приведены экспериментальные результаты исследований *in vivo* подавления экспрессии LPA с применением множества средств для RNAi_LPA в однократной дозе 3 мг/кг, 6 мг/кг и 10 мг/кг соответственно.

AD№	Процент mRNA LPA человека, сохранившейся в печени	Доза
-----	---	------

дуплекса	мышей, определяли посредством qPCR (среднее значение \pm SD).		(мг/кг)
	Среднее значение	SD	
AD00436	0,31	0,07	3
	0,29	0,07	6
	0,29	0,20	10
AD00337	0,59	0,23	3
	0,72	0,39	6
	0,46	0,23	10

Пример 10. Тестирование дуплекса siRNA LPA *in vivo*

Для оценки активности siRNA LPA *in vivo* применяли мышей, инфицированных AAV, кодирующим LPA человека и ген люциферазы (4 мыши на группу). Самок мышей C57BL/6J инфицировали за 7 дней до введения siRNA путем внутривенной инъекции исходного раствора 2×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего LPA человека и ген люциферазы. В день 0 мышам путем подкожной инъекции вводили однократную дозу 2 мг/кг или 6 мг/кг средства на основе siRNA LPA или PBS. Собирали образцы крови в день 0, перед введением siRNA и в конце дня 7, 14 и 21 соответственно. Измеряли люциферазную активность. Процент нокдауна рассчитывали путем сравнения люциферазной активности в образцах крови из группы, обработанной с помощью siRNA, перед введением и люциферазной активности в образцах крови, собранных в конце дня 7, 14 и 21, и проведения нормализации на основании изменений люциферазной активности в образцах сыворотки крови, полученных от группы, обработанной с помощью PBS. В результате, как показано в таблице 8, применяемый дуплекс AD№ получают из последовательности, соответствующей последовательности, показанной в таблице 3.

В таблице 8 представлены экспериментальные результаты исследований *in vivo* подавления экспрессии LPA с применением множества средств для RNAi LPA_ в однократной дозе 2 и 6 мг/кг, и в дни 7, 14 и 21 оставшуюся люциферазную активность по сравнению с днем 0 подвергали нормализации относительно изменения в группе, обработанной с помощью PBS (среднее значение \pm SD).

AD№ дуплекса	Люциферазная активность относительно PBS (среднее значение \pm SD)			Доза (мг/кг)
	День 7	День 14	День 21	
PBS	1,00 \pm 0,38	1,00 \pm 0,23	1,00 \pm 0,37	
AD00436	0,53 \pm 0,36	0,45 \pm 0,09	0,40 \pm 0,29	2

AD00436	0,34± 0,07	0,30± 0,06	0,31± 0,11	6
AD00474	0,98± 0,66	0,52± 0,20	0,66± 0,39	2
AD00474	0,36± 0,16	0,19± 0,10	0,21± 0,07	6
AD00475	0,48± 0,21	0,34± 0,17	0,34± 0,21	2
AD00475	0,47± 0,20	0,15± 0,03	0,18± 0,12	6
AD00476	0,75± 0,33	0,38± 0,13	0,52± 0,26	2
AD00476	0,65± 0,04	0,36± 0,14	0,29± 0,16	6
AD00479	0,53± 0,34	0,41± 0,19	0,53± 0,25	2
AD00479	0,41± 0,17	0,34± 0,08	0,31± 0,17	6
AD00480	0,35± 0,15	0,23± 0,02	0,24± 0,13	2
AD00480	0,28± 0,07	0,15± 0,05	0,24± 0,08	6
AD00482	0,71± 0,37	0,50± 0,13	0,56± 0,27	2
AD00482	0,41± 0,33	0,27± 0,08	0,31± 0,08	6
AD00474-1	0,42± 0,11	0,35± 0,11	0,29± 0,04	6
AD00478-1	0,54± 0,15	0,28± 0,08	0,37± 0,01	6
AD00482-1	0,24± 0,15	0,28± 0,14	0,15± 0,04	6
AD00337	0,41± 0,19	0,62± 0,21	0,74± 0,16	2
AD00337	0,47± 0,21	0,45± 0,33	0,37± 0,19	6
AD00150	0,83± 0,35	0,74± 0,26	0,58± 0,10	2
AD00150	0,41± 0,20	0,25± 0,09	0,28± 0,24	6

Пример 11. Тестирование дуплекса siRNA LPA *in vivo*

Для оценки активности siRNA LPA *in vivo* в данное исследование были привлечены самцы яванских макаков (в возрасте 13-22 года, весящие 7-9 кг), по 3 животных в каждой группе. Каждому животному путем подкожной инъекции вводили 2 мг/кг тестируемого изделия. Применяемые тестируемые изделия соответствовали соединениям, показанным в таблице 3 (AD00377-1, AD00436-1, AD00480, AD00480-1, AD00480-2 и AD00474-2).

После ночного голодания проводили сбор крови в дни -14 (до введения), -7 (до введения), 1 (до введения) и дни 8, 15, 22, 29, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92 и 99 после введения. Взятые образцы крови выдерживали для свертывания при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин и затем центрифугировали при 3500 об./мин в течение 10 мин при 4°C. Собранную сыворотку крови (примерно 1,0 мл) переносили в два предварительно помеченных полипропиленовых флакона с

завинчивающимися крышками (0,5 мл/флакон, один для анализа ELISA, а другой запасной) и хранили в холодильнике при -80°C до тестирования. Оставшийся процент LPA (нормализованный относительно среднего значения для дня -14 (до введения), -7 (до введения) и 1 (до введения) перед введением siRNA) показан на фиг. 1.

Пример 12. Тестирование дуплекса siRNA LPA *in vivo*

Для оценки активности siRNA LPA *in vivo* в данное исследование были привлечены самцы яванских макаков (в возрасте 2-6 лет, весящие 2-6 кг), по 4 животных в каждой группе. Каждому животному путем подкожной инъекции вводили физиологический раствор или 2 мг/кг тестируемого продукта AD00480-8. Применяемый тестируемый продукт AD00480-8 соответствует соединению, показанному в таблице 3. После ночного голодания проводили сбор крови в дни -14 (до введения), 0 (до введения) и дни 7, 14 и 21 после введения. Взятые образцы крови выдерживали для свертывания при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин и затем центрифугировали при 3500 об./мин в течение 10 мин при 4°C . Собранную сыворотку крови (примерно 1,0 мл) переносили в два предварительно помеченных полипропиленовых флакона с завинчивающимися крышками (0,5 мл/флакон, один для анализа ELISA, а другой запасной) и хранили в холодильнике при -80°C до тестирования. Оставшийся процент LPA (нормализованный относительно среднего значения для дня -14 (до введения) и 0 (до введения) перед введением siRNA) показан на фиг. 2.

Пример 13. Скрининг *in vitro* дуплексов siRNA LPA с применением клеток Huh7 и вектора с двумя флуоресцентными репортерными генами.

Клетки Huh7 доводили до соответствующей плотности и затем высевали в 96-луночные планшеты. Согласно рекомендациям производителя, одновременно с инокуляцией вектором psciCHECK2 с двумя флуоресцентными репортерными генами, содержащим целевой ген, совместно с siRNA трансфицировали клетки Huh7 с применением Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen-13778-150). Клетки трансфицировали тестируемыми siRNA или контрольными siRNA. SiRNA тестировали в трех повторностях в двух концентрациях (0,1 нМ и 1,0 нМ) и через 48 ч после трансфекции добавляли реагент для люциферазного анализа Dual-Glo® для определения значений флуоресценции. Соотношение люминесценции люциферазы *Renilla* и люминесценции люциферазы светлячка рассчитывали и подвергали нормализации на основании соотношения контрольных образцов, обработанных с помощью siRNA, для расчета эффективности нокдауна. В результате, как показано в таблице 9, применяемый дуплекс AV№ получают из последовательности, соответствующей последовательности, показанной в таблице 2.

В таблице 9 представлены экспериментальные результаты исследований *in vitro* подавления экспрессии LPA с применением множества средств для RNAi LPA.

Соединение	% подавления (СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ \pm SD)		Соединение	% подавления (СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ \pm SD)	
	1 нМ	0,1 нМ		1 нМ	0,1 нМ

AV01867	46,80±4,94	20,67±6,22	AV01921	43,98±3,11	10,24±2,51
AV01868	49,97±3,00	21,34±5,62	AV01922	48,03±3,11	16,51±1,01
AV01873	22,50±6,76	6,04±3,83	AV01923	50,53±4,02	30,41±4,87
AV01874	20,31±1,71	1,22±8,37	AV01924	57,72±3,14	34,72±1,99
AV01875	27,87±1,62	-5,41±4,13	AV01925	49,37±3,12	28,89±5,77
AV01876	25,57±6,31	-7,12±10,15	AV01926	57,83±4,08	38,92±1,85
AV01877	32,85±3,12	7,02±1,04	AV01927	32,41±9,25	16,81±3,52
AV01878	37,56±0,72	2,90±8,20	AV01928	58,81±3,31	40,57±2,02
AV01879	38,63±0,47	14,23±4,04	AV01929	58,05±4,18	33,99±5,29
AV01880	36,24±5,54	9,07±11,68	AV01930	58,89±3,50	35,67±3,53
AV01881	45,01±3,67	19,69±5,00	AV01931	49,37±2,20	19,50±3,95
AV01882	35,40±2,43	7,05±4,97	AV01932	30,69±0,79	4,38±5,60
AV01883	44,89±0,46	13,21±3,78	AV01934	34,14±3,07	13,58±4,37
AV01884	26,17±1,54	12,79±1,48	AV01935	44,01±2,35	16,32±4,15
AV01885	25,52±7,87	10,49±2,89	AV01936	50,96±4,79	24,30±9,44
AV01892	53,83±2,87	25,26±5,37	AV01937	48,58±2,39	14,95±3,03
AV01893	36,28±2,27	6,31±2,85	AV01938	32,80±16,53	4,91±7,45
AV01894	35,36±3,10	11,69±5,37	AV01939	53,10±3,18	27,01±2,43
AV01895	45,05±3,74	23,56±4,75	AV01940	50,61±0,41	25,92±2,96
AV01896	40,16±7,76	17,86±5,24	AV01941	60,07±2,85	35,89±2,87
AV01897	45,63±7,21	19,64±4,51	AV01942	53,04±2,48	25,26±6,30
AV01898	49,62±9,10	16,53±7,32	AV01943	54,83±2,70	29,55±3,91
AV01899	57,70±3,74	35,66±2,89	AV01944	53,74±3,75	23,32±1,22
AV01900	53,18±2,20	30,51±3,16	AV01945	56,37±2,30	25,57±1,53
AV01901	44,34±6,20	13,45±5,55	AV01946	54,40±1,99	27,22±1,92
AV01904	35,60±7,26	2,08±11,15	AV01947	46,31±3,73	10,99±5,81
AV01905	40,65±4,84	15,01±4,32	AV01948	34,03±5,43	13,50±5,30
AV01906	44,74±0,90	13,56±2,16	AV01949	29,76±2,51	7,70±1,98
AV01907	34,73±0,26	14,73±1,92	AV01952	49,08±1,47	27,95±4,70
AV01908	49,62±7,01	31,33±6,37	AV01953	46,02±3,99	21,19±4,05
AV01909	47,80±0,70	21,96±2,27	AV01954	48,61±1,50	25,36±2,97
AV01910	51,88±0,67	20,22±6,09	AV01955	53,20±2,87	30,14±2,11
AV01911	35,42±2,80	11,40±6,02	AV01956	53,62±4,74	35,02±4,48
AV01912	49,53±7,27	20,62±3,24	AV01957	54,16±3,13	13,92±6,54

AV01913	47,11±0,39	17,63±1,31	AV01958	57,25±3,76	28,45±5,01
AV01914	45,76±1,63	22,16±4,50	AV01959	57,76±2,66	35,48±2,07
AV01915	48,93±1,28	23,82±3,60	AV00124	60,09±1,74	33,15±2,78
AV01916	32,73±3,88	-3,38±3,58	AV00142	56,94±1,21	27,73±1,55
AV01917	23,54±4,29	-0,21±6,61			

Эквивалент

Хотя в данном документе было описано и проиллюстрировано несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники легко понять, что существует ряд других способов и/или структур для реализации описанных в данном документе функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, и каждое из данных изменений и/или модификаций считается входящим в объем настоящего изобретения. В более общем смысле, специалистам в данной области техники будет легко понять, что все описанные в данном документе параметры, размеры, материалы и конфигурации являются иллюстративными и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения, в котором используются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники узнают или смогут определить многие эквиваленты описанных в данном документе конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения с применением только стандартных экспериментов. Поэтому следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены только в качестве примера и подпадают под объем пунктов прилагаемой формулы изобретения и их эквивалентов, и что настоящее изобретение может быть реализовано способом, отличным от того, который конкретно описан и заявлен для охраны. Настоящее изобретение направлено на каждое из отдельных признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, описанных в данном документе. Кроме того, в объем настоящего изобретения также включена любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не противоречат друг другу.

Все определения, которые представлены и используются в данном документе, следует понимать как относящиеся к словарным определениям, определениям в файлах, включенных посредством ссылки, и/или обычным значениям определенных терминов.

Если в описании и формуле изобретения не используются количественные ограничения, их следует понимать как "по меньшей мере один", если явно не указано обратное.

Фразы "и/или", используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как обозначающие "один или оба" из объединенных таким образом элементов, т. е. такие элементы появляются в комбинации в некоторых случаях и отдельно в других. В дополнение к элементам, конкретно обозначенным "и/или", могут необязательно существовать другие элементы, независимо от того, связаны они или нет с этими

конкретно обозначенными элементами, если явно не указано обратное.

Все ссылки, патенты и патентные заявки и публикации, процитированные или упомянутые в настоящей заявке, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), которое подавляет экспрессию LPA (Apo(a)), где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить и необязательно содержит нацеливающий лиганд; область, комплементарная РНК-транскрипту LPA, содержится в нуклеотидных положениях 2-18 в антисмысловой нити, где комплементарная область содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, которые отличаются на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от одной из антисмысловых последовательностей, указанных в одной из таблиц 1-3.

2. Средство на основе dsRNA по п. 1, где область, комплементарная РНК-транскрипту LPA, содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 последовательных нуклеотидов, которые отличаются на не более чем 3 нуклеотида от одной из антисмысловых последовательностей, указанных в одной из таблиц 1-3.

3. Средство на основе dsRNA по п. 1 или п. 2, где антисмысловая нить dsRNA в по меньшей мере значительной степени комплементарна любой целевой области в mRNA гена LPA человека и представлена в любой из таблиц 1-3.

4. Средство на основе dsRNA по п. 3, где антисмысловая нить dsRNA полностью комплементарна любой целевой области в mRNA гена LPA человека и представлена в любой из таблиц 1-3.

5. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность смысловой нити, изложенную в любой из таблиц 1-3, где последовательность смысловой нити в по меньшей мере значительной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA.

6. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность смысловой нити, изложенную в любой из таблиц 1-3, где последовательность смысловой нити полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити в средстве на основе dsRNA.

7. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность антисмысловой нити, указанную в любой из таблиц 1-3.

8. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит последовательность, указанную как дуплексная последовательность в любой из таблиц 1-3.

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

10. Средство на основе dsRNA по п. 1, где все или практически все нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

11. Средство на основе dsRNA по п. 5 или п. 6, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид предусматривает 2'-О-метилнуклеотид, 2'-фторнуклеотид, 2'-дезоксинуклеотид, миметик 2',3'-секонуклеотида, закрытый нуклеотид, нуклеотид незамкнутой нуклеиновой кислоты (UNA), нуклеотид гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), 2'-F-арабинозный нуклеотид, 2'-метоксиэтилнуклеотид, нуклеотид без основания,

рибит, обратный нуклеотид, обратный нуклеотид без основания, обратный 2'-ОМе-нуклеотид, обратный 2'-дезоксинуклеотид, 2'-аминомодифицированный нуклеотид, 2'-алкиломодифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид и 3'-ОМе-нуклеотид, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, или концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-аминомодифицированный нуклеотид, фосфорамидат или нуклеотид, содержащий неприродное основание.

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

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

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

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

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

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

18. Средство на основе dsRNA по п. 1, где все или практически все нуклеотиды смысловой нити и антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

19. Средство на основе dsRNA по п. 1, где модифицированная смысловая нить представляет собой модифицированную последовательность смысловой нити, указанную в одной из таблиц 2-3.

20. Средство на основе dsRNA по п. 1, где модифицированная антисмысловая нить представляет собой модифицированную последовательность антисмысловой нити, указанную в одной из таблиц 2-3.

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

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

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

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

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

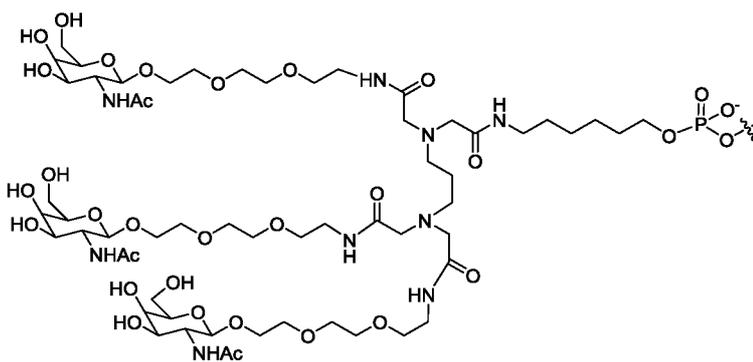
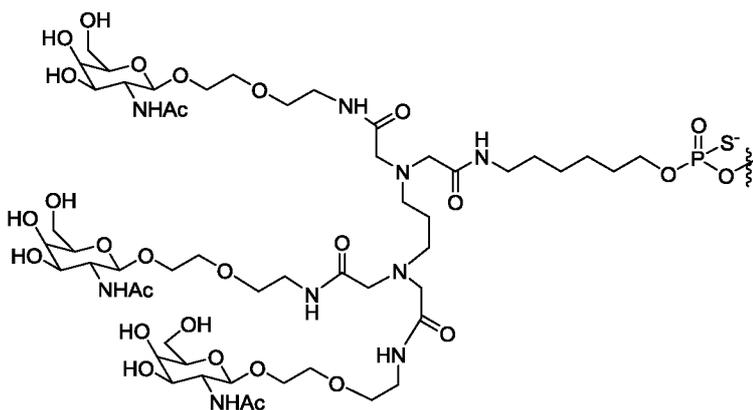
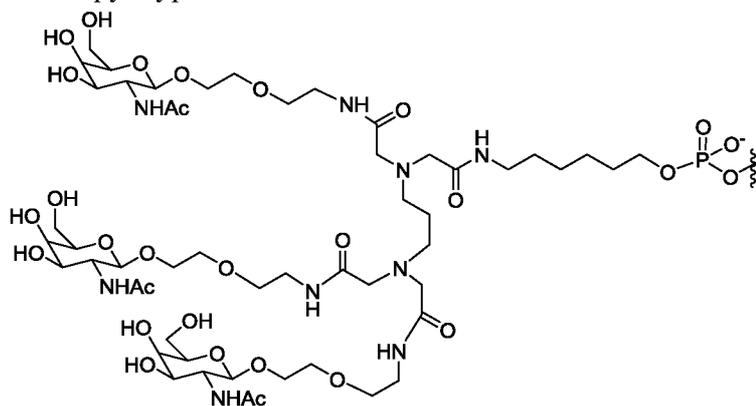
26. Средство на основе dsRNA по п. 1, где средство на основе dsRNA содержит по

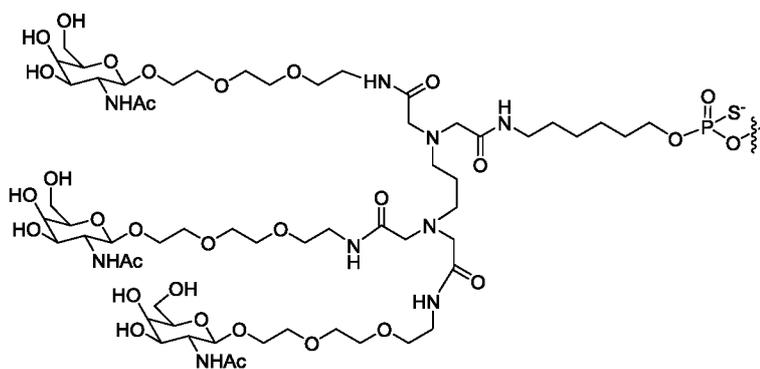
меньшей мере один модифицированный нуклеотид и дополнительно содержит одну или несколько нацеливающих групп или связывающих групп.

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

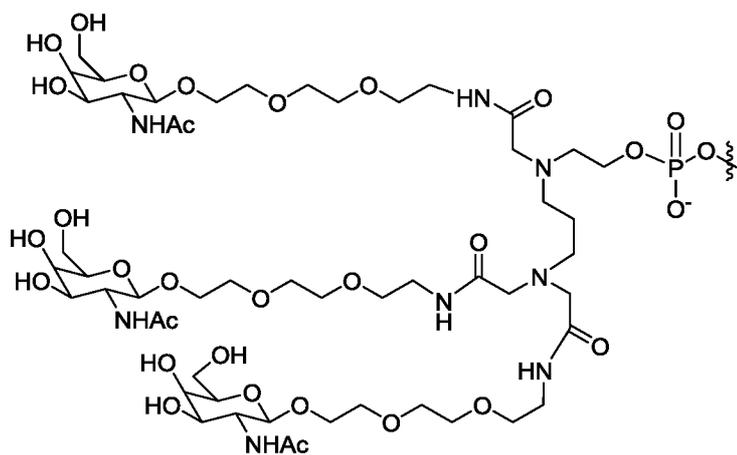
28. Средство на основе dsRNA по п. 26 или п. 27, где нацеливающие группы или связывающие группы содержат N-ацетилгалактозамин (GalNAc).

29. Средство на основе dsRNA по п. 26 или п. 27, где нацеливающие группы имеют следующие структуры:

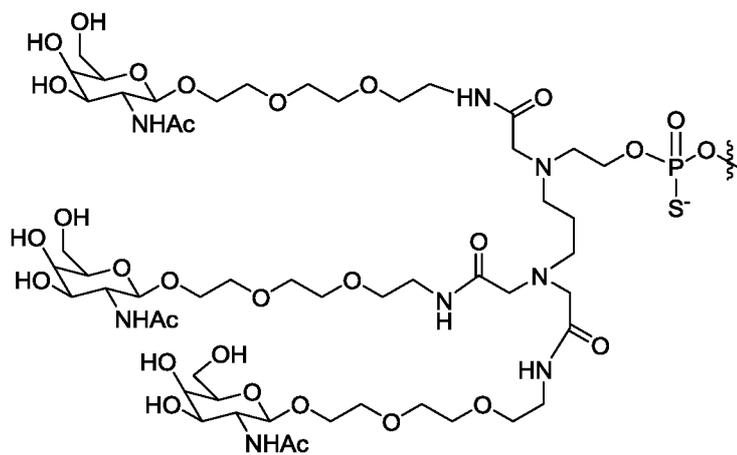




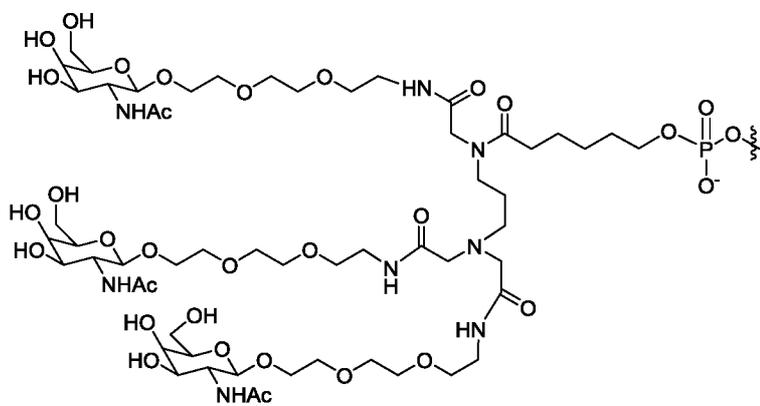
GLS-2,



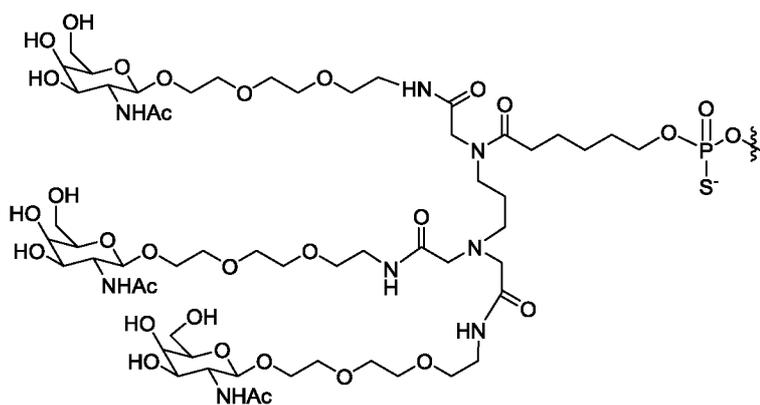
GLO-3,



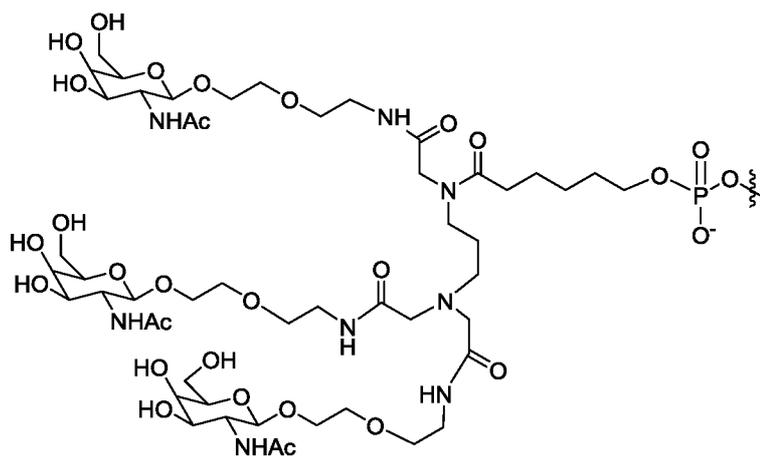
GLS-3,



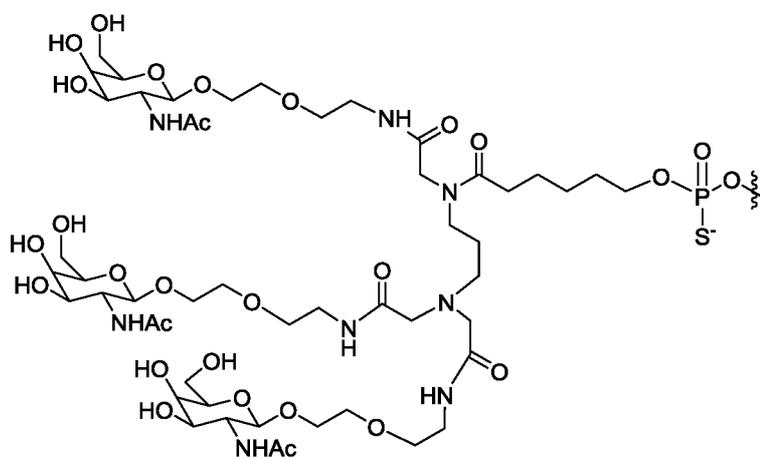
GLO-4,



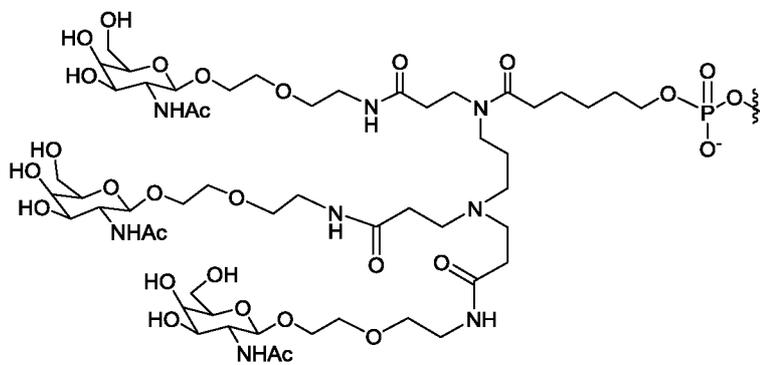
GLS-4,



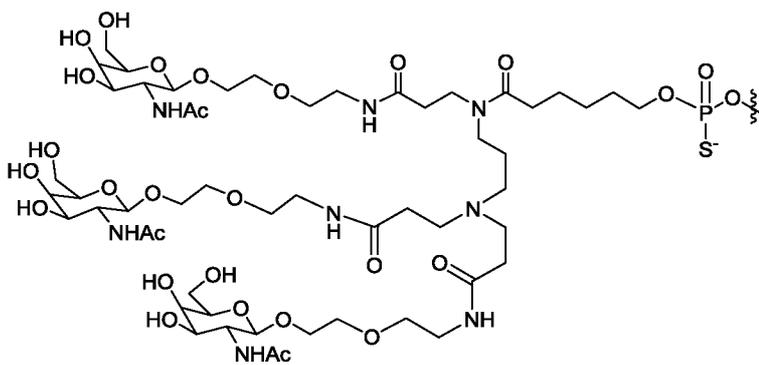
GLO-5,



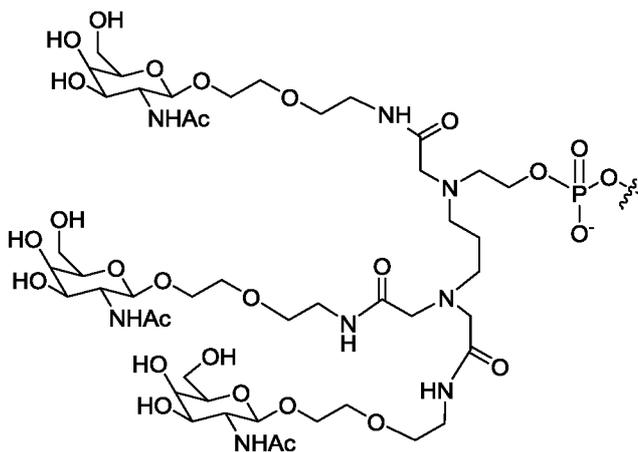
GLS-5,



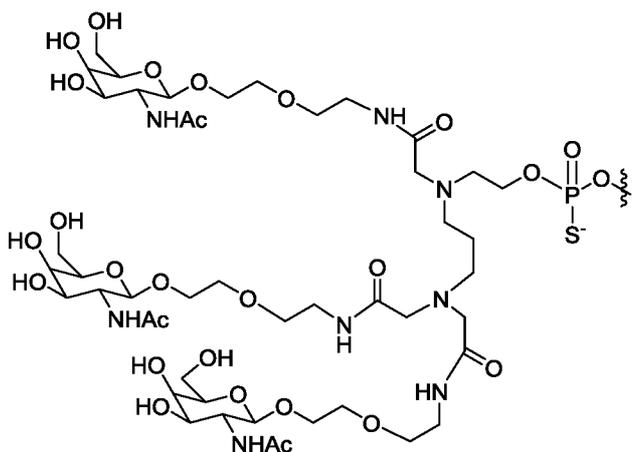
GLO-6,



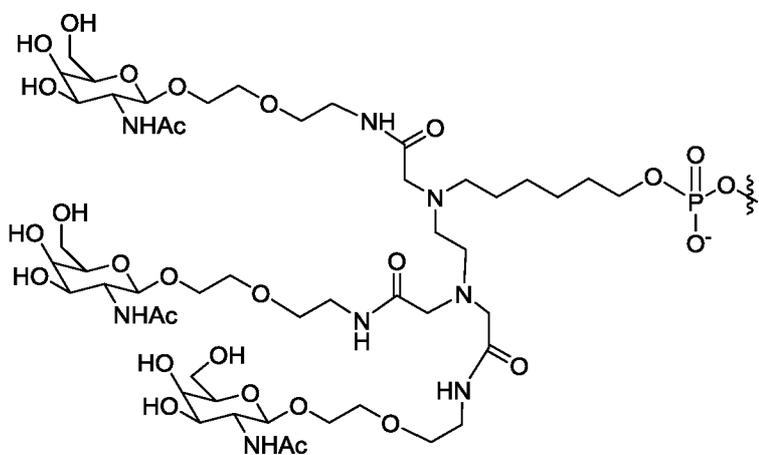
GLS-6,



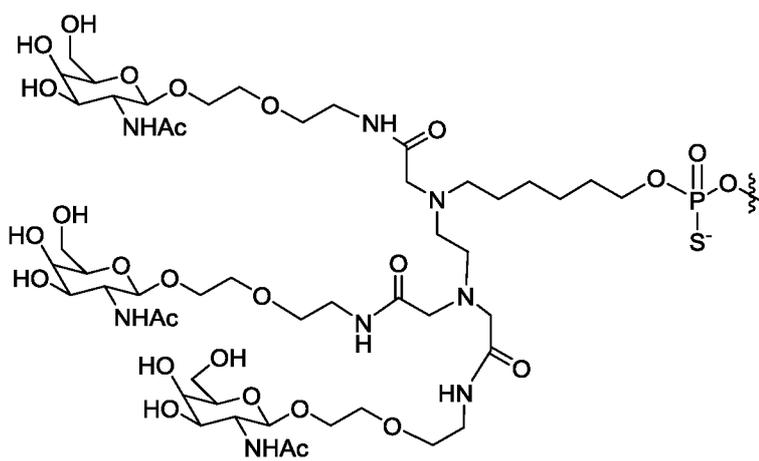
GLO-7,



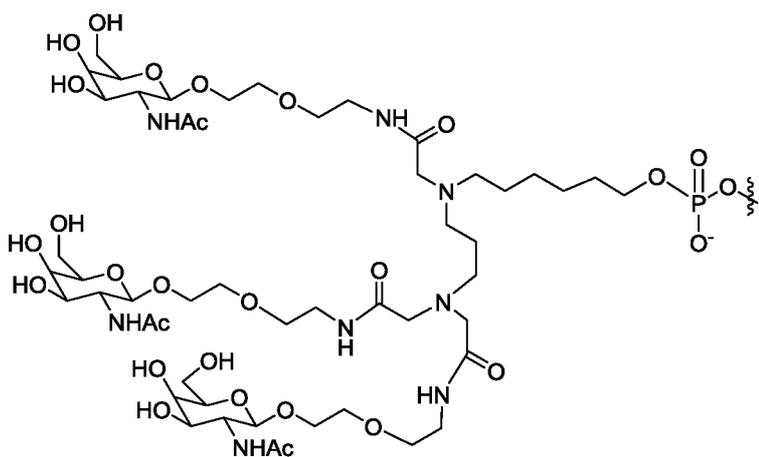
GLS-7,



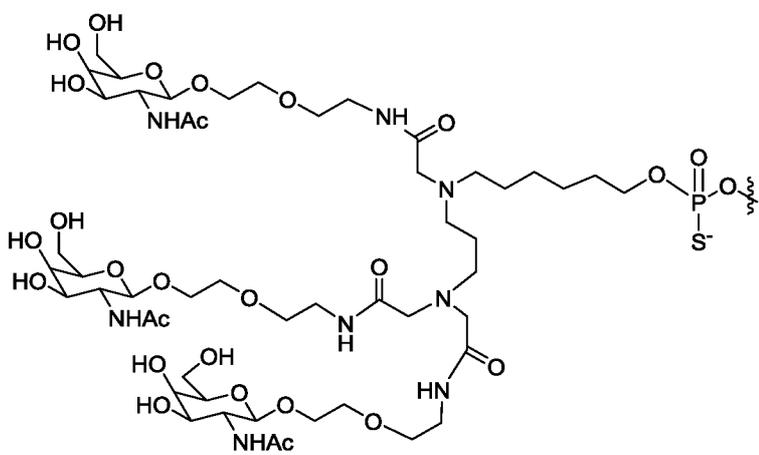
GLO-8,



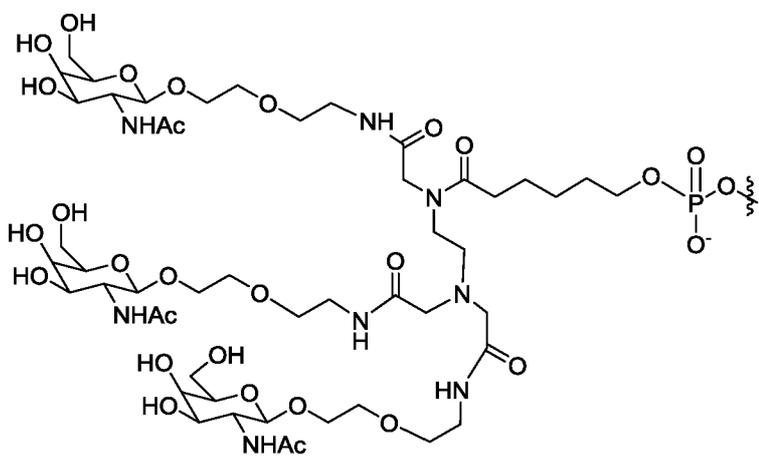
GLS-8,



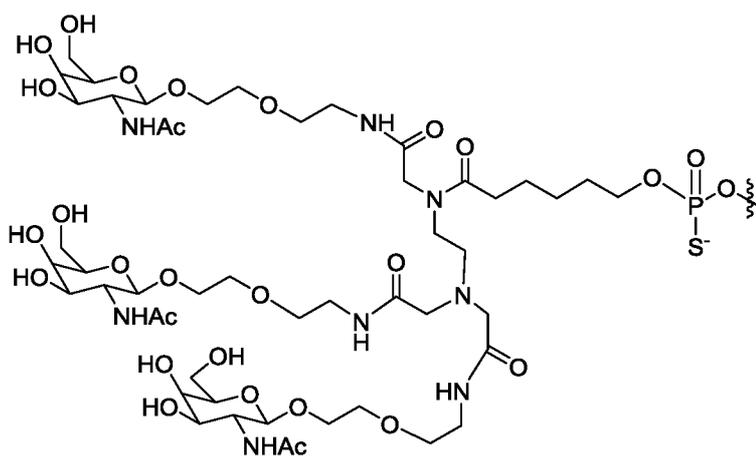
GLO-9,



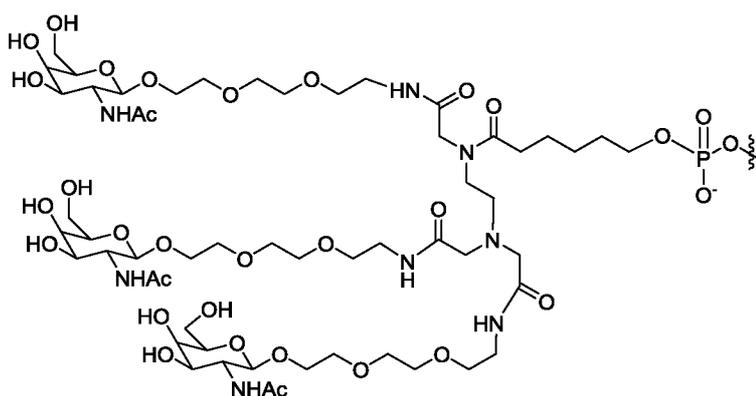
GLS-9,



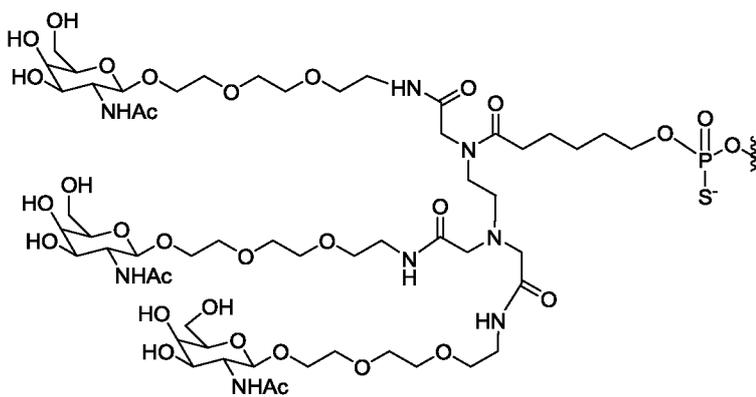
GLO-10,



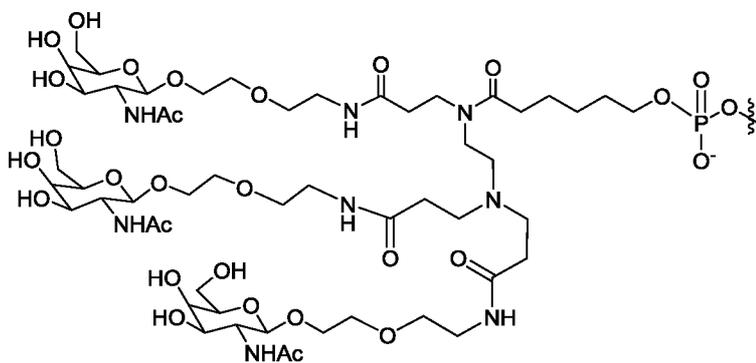
GLS-10,



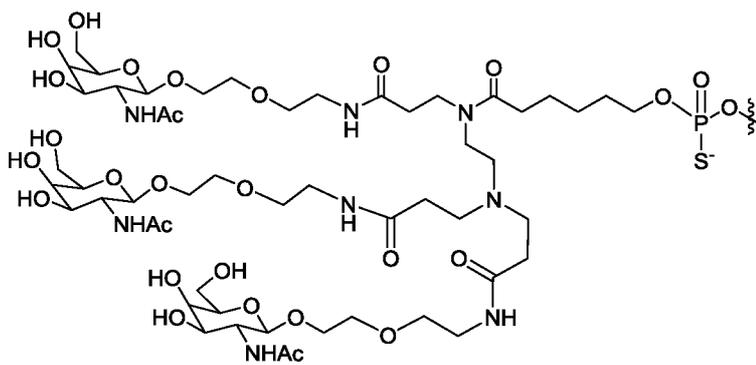
GLO-11,



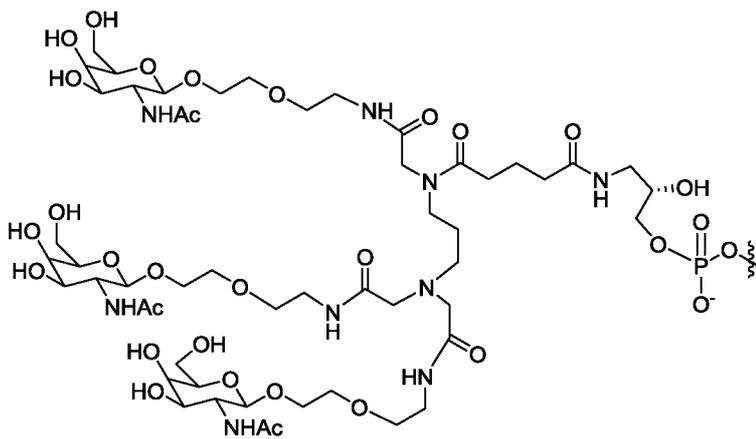
GLS-11,



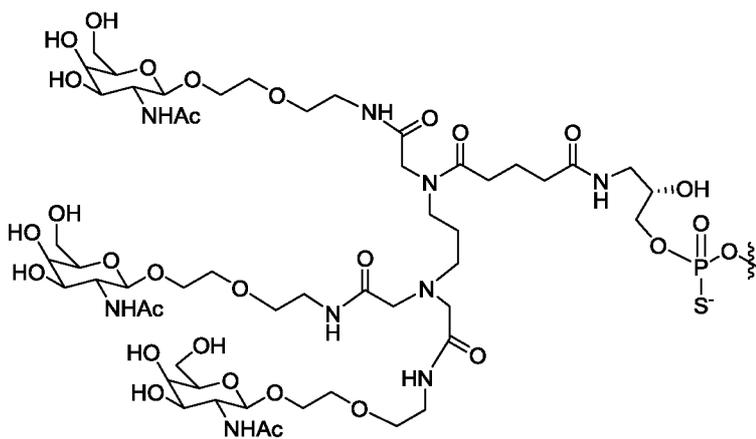
GLO-12,



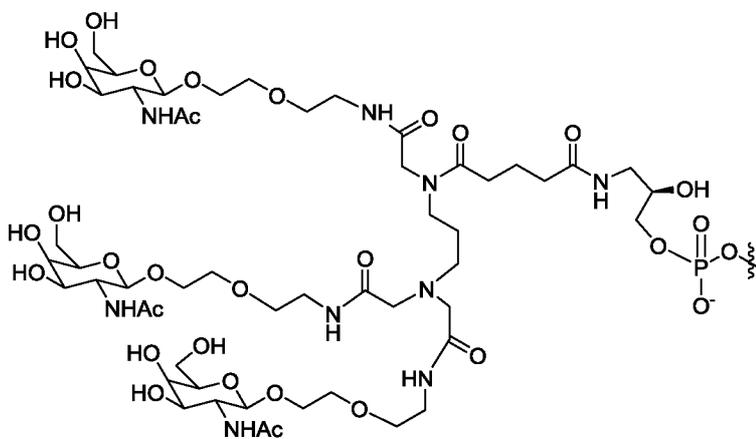
GLS-12,



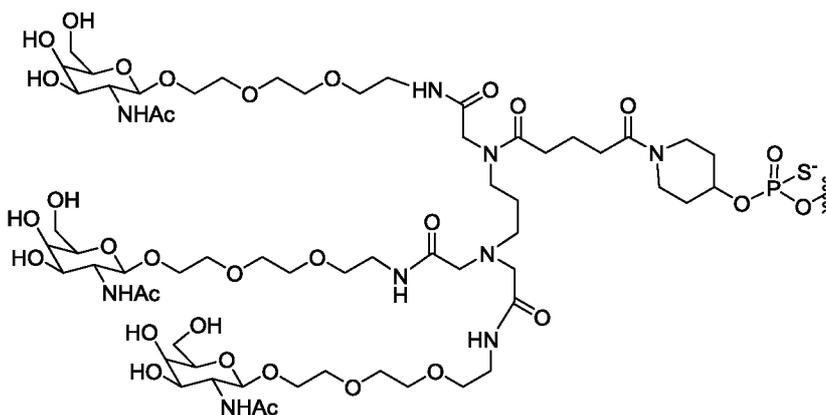
GLO-13,



GLS-13,



GLO-14,



GLS-16.

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

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

32. Средство на основе dsRNA по п. 1, где антисмысловая нить содержит один обратный остаток без основания на 3'-конце.

33. Средство на основе dsRNA по п. 1, где смысловая нить содержит один или два обратных остатка без основания на 3'-конце и/или 5'-конце, или смысловая нить содержит один или два остатка изоманнита на 3'-конце и/или 5'-конце.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

44. Способ подавления экспрессии гена LPA в клетке, включающий

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

45. Способ по п. 44, дополнительно включающий

(ii) поддержание клетки, полученной в (i) из п. 44, в течение периода времени, достаточного для того, чтобы вызвать разрушение mRNA-транскрипта гена LPA, за счет чего подавляется экспрессия гена LPA в клетке.

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

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

48. Способ по п. 46 или п. 47, дополнительно включающий оценивание подавляющего эффекта в отношении гена LPA после введения средства на основе dsRNA субъекту, где способы оценки включают

(i) идентифицирование одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта и

(ii) сравнение идентифицированных физиологических характеристик с исходными физиологическими характеристиками до лечения связанного с LPA заболевания или состояния и/или контроля физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния,

где сравнение указывает на одно или несколько из наличия или отсутствия подавления экспрессии гена LPA у субъекта.

49. Способ по п. 48, где идентифицированной физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови.

50. Способ по п. 49, где снижение уровня Lp(a) в крови субъекта указывает на снижение экспрессии гена LPA у субъекта.

51. Способ подавления экспрессии гена LPA у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41.

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

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

54. Способ по любому из пп. 51-53, дополнительно включающий оценивание подавляющего эффекта в отношении гена LPA после введения средства на основе dsRNA субъекту, где способы оценки включают

(i) идентифицирование одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта и

(ii) сравнение идентифицированных физиологических характеристик с исходными физиологическими характеристиками до лечения связанного с LPA заболевания или состояния и/или контроля физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния,

где сравнение указывает на одно или несколько из наличия или отсутствия подавления экспрессии гена LPA у субъекта.

55. Способ по п. 54, где идентифицированной физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови.

56. Способ по п. 55, где снижение уровня Lp(a) в крови субъекта указывает на снижение экспрессии гена LPA у субъекта.

57. Способ лечения и предупреждения связанного с белком LPA заболевания или состояния, включающий введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41 для подавления экспрессии гена LPA.

58. Способ по п. 57, где заболевание или состояние представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, где сердечно-сосудистое заболевание предусматривает болезнь Бергера, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь сердца, метаболический синдром, острый коронарный синдром, аортальный стеноз, аортальную регургитацию, расслоение аорты, окклюзию артерии сетчатки, цереброваскулярные заболевания, мезентериальный тромбоз, окклюзию верхней брыжеечной артерии, стеноз почечной артерии, стабильную/нестабильную стенокардию, острый коронарный синдром, гетерозиготную или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию, гиперapoлипопротеинбетапопротеинемиию, цереброваскулярный атеросклероз, цереброваскулярные заболевания и венозный тромбоз, инсульт, атеросклероз, тромбоз, формы ишемической болезни сердца или аортальный стеноз и/или любые другие заболевания или патологии, связанные с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц.

59. Способ по п. 57, дополнительно включающий назначение субъекту дополнительной терапевтической схемы.

60. Способ по п. 59, где дополнительная терапевтическая схема предусматривает введение субъекту одного или нескольких антисмысловых полинуклеотидов LPA по настоящему изобретению, введение субъекту терапевтического средства, отличного от средства на основе dsRNA LPA, и поведенческие модификации у субъекта.

61. Способ по п. 60, где терапевтическое средство, отличное от средства на основе dsRNA LPA, представляет собой одно или несколько дополнительных терапевтических средств, таких как ингибитор HMG-Co-A-редуктазы (статины), эзетимиб, ингибитор PCSK-9, ингибитор СТЕР, средство терапии, нацеливающееся на ANGPTL3, средство терапии, нацеливающееся на AGT, средство терапии, нацеливающееся на APOC3, и ниацин или любая их комбинация.

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

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

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

65. Способ по п. 64, где способ определения эффективности лечения у субъекта

включает

(i) идентифицирование одной или нескольких физиологических характеристик связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта и

(ii) сравнение идентифицированных физиологических характеристик с исходными физиологическими характеристиками до лечения связанного с LPA заболевания или состояния,

где сравнение указывает на одно или несколько из наличия или отсутствия эффективности и уровня эффективности введения субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA).

66. Способ по п. 65, где идентифицированной физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови.

67. Способ по п. 65, где снижение уровня Lp(a) в крови субъекта указывает на наличие эффективности введения субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA).

68. Способ снижения уровня белка LPA у субъекта по сравнению с исходным уровнем белка LPA у субъекта до лечения, включающий введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41 для снижения уровня экспрессии гена LPA.

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

70. Способ изменения физиологической характеристики связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта по сравнению с исходной физиологической характеристикой связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) по любому из пп. 1-36 или композиции по любому из пп. 37-41 для изменения физиологической характеристики связанного с LPA заболевания или состояния у субъекта.

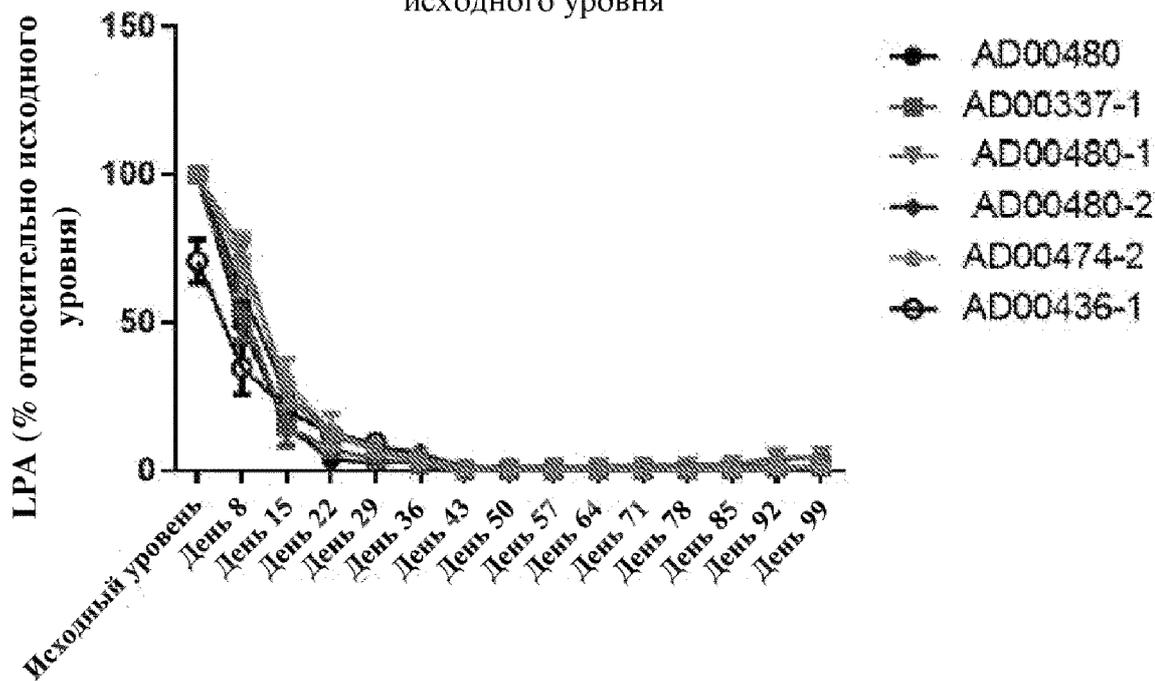
71. Способ по п. 70, где средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно или вводят субъекту путем IV-введения.

72. Способ по п. 70, где физиологической характеристикой является уровень Lp(a) в крови.

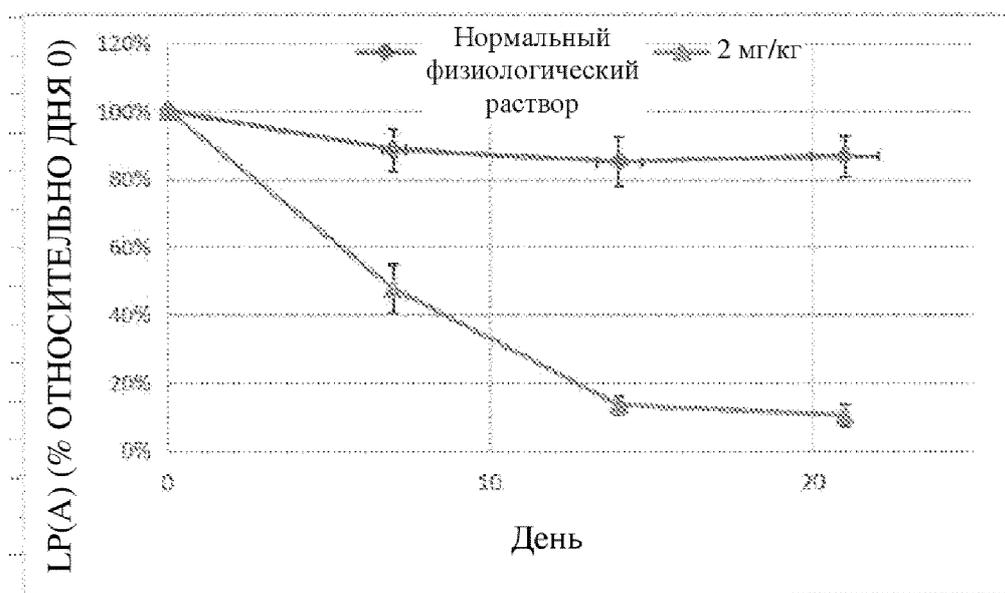
По доверенности

1/1

Уровень LPA в сыворотке крови,
нормализованный относительно
исходного уровня



Фиг. 1



Фиг. 2