# Евразийское (11) **036477** (13) **B1** (19)патентное ведомство

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.11.16

**(21)** Номер заявки

201690685

(22) Дата подачи заявки

2014.10.03

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01) **A61K 31/7088** (2006.01) **A61K 31/713** (2006.01) **A61P 3/00** (2006.01)

# (54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ALAS1

- **(31)** 61/887,288; 61/983,720
- (32)2013.10.04; 2014.04.24
- (33)US
- (43) 2016.07.29
- (86) PCT/US2014/059160
- (87) WO 2015/051318 2015.04.09
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.; ИКАН СКУЛ ОФ МЕДСИН ЭТ МАУНТ СИНАЙ (US)

(72) Изобретатель:

Беттенкорт Брайан, Фитцжеральд Кевин, Куэрбс Уилльям, Десник Роберт Дж., Ясуда Макико (US)

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

(56) YAO X. ET AL.: "Heme controls the regulation of protein tyrosine kinases Jak2 and Src", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 403, no. 1, 3 December 2010 (2010-12-03), pages 30-35, XP027536757. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/ J.BBRC.2010.10.101 [retrieved on 2010-10-29], page 31, right-hand column

NARESH KUMAR ET AL.: "Regulation of Adipogenesis by Natural and Synthetic REV-ERB Ligands", ENDOCRINOLOGY, vol. 151, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 3015-3025, XP055100265, ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/en.2009-0800, page

3017, left-hand column

J. L. ESTALL ET AL.: "PGC-1 negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-Erb axis", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 52, 29 December 2009 (2009-12-29), pages 22510-22515, XP055071011, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0912533106, page 22513, right-hand column - page 22514, left-hand column

L. YIN ET AL.: "Rev-erb, a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways", SCIENCE, vol. 318, no. 5857, 14 December 2007 (2007-12-14), pages 1786-1789, XP055071004, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1150179, page 1788, left-hand column; figure s12

"ALAS1 Pre-design Chimera INTERNET CITATION, 22 January 2010 (2010-01-22), pages 1-2, XP002701598, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abnova.com/ PDFServer/outputs/H00000211-R02.pdf [retrieved on 2013-07-11]

EP-A2-2213738

M. BALWANI ET AL.: "The porphyrias: advances in diagnosis and treatment", BLOOD, vol. 120, no. 23, 29 November 2012 (2012-11-29), pages 4496-4504, XP055093645, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-05-423186

WO-A2-2013155204

M. YASUDA ET AL.: "RNAi-mediated silencing of hepatic ALAS1 effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 21, 12 May 2014 (2014-05-12), pages 7777-7782, XP055165224, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1406228111, the whole document

HOMEDAN CHADI ET "Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in **JOURNAL** INTERNĂTIONAL model" BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, 51, 13 April 2014 (2014-04-13), pages 93-101, XP029026620, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/ J.BI0CEL.2014.03.032, the whole document

Изобретение относится к композициям на основе двунитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), (57)нацеленной на ген ALAS1, и способам применения таких композиций на основе dsRNA для изменения (например, ингибирования) экспрессии ALAS1.

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/887288, поданной 4 октября 2013 г., и предварительной заявки на патент США № 61/983720, поданной 24 апреля 2014 г. Полное содержание каждой из упомянутых выше заявок, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки.

#### Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и, таким образом, включен в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте. Указанная копия файла с кодировкой ASCII, созданная 2 октября 2014 г., имеет название A2038-7202WO SL.txt, и ее размер составляет 1107486 байт.

## Область изобретения

Настоящее изобретение относится к специфическому ингибированию экспрессии гена ALAS1.

# Уровень техники

Врожденные порфирии представляют собой семейство нарушений, возникающих в результате недостаточной активности определенных ферментов в рамках пути биосинтеза гема, также называемым в данном документе порфириновым путем. Недостаточность ферментов порфиринового пути приводит к неполному образованию гема и к накоплению предшественников порфиринов и порфиринов, которые в высоких концентрациях токсичны для ткани.

Из ряда врожденных порфирии, острая перемежающаяся порфирия (АІР, например, аутосомнодоминантная AIP), вариегатная порфирия (VP, например, аутосомно-доминантная VP), наследственная копропорфирия (копропорфирия или НСР, например, аутосомно-доминантная НСР), и порфирия, обусловленная недостаточностью дегидратазы 5'-аминолевулиновой кислоты (также известной как 5аминолевулиновая кислота или ALA) (ADP, например, аутосомно-рецессивная ADP) классифицируются как острые печеночные порфирии и проявляются острыми неврологическими приступами, которые могут быть опасными для жизни. Острые приступы характеризуются симптомами, связанными с вегетативной, периферической и центральной нервной системы, в том числе болью в животе, гипертензией, тахикардией, запором, двигательной слабостью, параличом и судорогами. При ненадлежащем лечении может наступать квадриплегия, нарушение функции дыхания и смерть. Различные факторы, включая лекарственные средства, индуцирующие цитохромы Р450, режим питания и гормональные изменения, могут провоцировать острые приступы вследствие повышения активности синтазы 5' -аминолевулиновой кислоты печени 1 (ALAS1), первого и скорость-лимитирующего фермента пути биосинтеза гема. При острых порфириях, например, АІР, VP, НСР и АDP, недостаточность соответствующего фермента приводит к образованию и накоплению в печени одного или нескольких веществ (например, порфиринов и/или предшественников порфиринов, например, ALA и/или PBG), которые могут быть нейротоксичными и могут приводить к возникновению острых приступов. См., например, Balwani, M and Desnick, R.J., Blood, 120:4496-4504, 2012.

Современная терапия острых неврологических приступов заключается во внутривенном введении гемина (пангематина®, Lundbeck, или нормосанга®, Orphan Europe), который предусматривает экзогенный гем для ингибирования ALAS1 посредством отрицательной обратной связи, и, тем самым, снижает образование ALA и PBG. Гемин используют для лечения во время острого приступа и для предупреждения приступов, особенно у женщин с острыми порфириями, которые испытывают частые приступы при гормональных изменениях во время менструальных циклов. Хотя в целом у пациентов наблюдается хороший ответ на лечение, его эффект является медленным, при этом, как правило, требуется от двух до четырех дней или дольше для приведения концентраций ALA и PBG в моче к нормальным значениям.

Поскольку при внутривенном введении гемин быстро метаболизируется, как правило, требуется от трех до четырех инфузий для эффективного лечения или предупреждения острого приступа. Кроме того, повторяющиеся инфузий могут вызывать перенасыщение железом и флебит, который может нарушать доступ к периферическим венам. Несмотря на то, что ортотопическая трансплантация печени имеет лечебный эффект, эта процедура характеризуется серьезными осложнениями и смертностью, а наличие доноров печени ограничено. Таким образом, требуется альтернативный терапевтический подход, который является более эффективным, быстродействующим и безопасным. Было бы особенно предпочтительным, если бы такое лечение могло осуществляться с помощью подкожного введения, поскольку это исключило бы необходимость в инфузиях и длительной госпитализации.

АІР, также называемая недостаточностью порфобилиногендезаминазы (PBGD), или недостаточностью гидроксиметилбилансинтазы (HMBS), является наиболее распространенной среди острых печеночных порфирий. Распространенность АІР по оценкам составляет 5-10 на 100000, при этом приблизительно у 5-10% пациентов наблюдаются симптомы. АІР представляет собой аутосомно-доминантное нарушение, вызванное мутациями в гене HMBS, что приводит к пониженной, например, составляющей половину от нормы, активности фермента. Ранее мышиную модель АІР, характеризующуюся ~30% активности HMBS дикого типа, получали с помощью гомологичной рекомбинации. Как и у пациентов-людей, у этих мышей повышается активность печеночной ALAS1 и накапливаются большие количества ALA и PBG в плазме и моче при введении порфириногенных лекарственных средств, таких как фенобарбитал. В связи

с этим, они являются отличной моделью для оценки эффективности новых терапевтических средств для лечения острых печеночных порфирий.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение описывает способы и композиции на основе iRNA для модулирования экспрессии гена ALAS1. Согласно определенным вариантам осуществления уровень экспрессии гена ALAS1 снижают или ингибируют с применением iRNA, специфической по отношению к ALAS1. Такое ингибирование может быть пригодным при лечении нарушений, связанных с экспрессией ALAS1, таких как порфирий.

Соответственно, в данном документе описаны композиции и способы, которые влияют на расщепление РНК-транскриптов гена ALAS1, опосредованное индуцируемым РНК комплексом сайленсинга (RISC), например, в клетке или у субъекта (например, у млекопитающего, такого как человек). Также описаны композиции и способы лечения нарушения, связанного с экспрессией гена ALAS1, такого как порфирия, например, X-сцепленная сидеробластная анемия (XLSA), порфирия, обусловленная недостаточностью ALA-дегидратазы (порфирия Досса или ADP), острая перемежающаяся порфирия (AIP), врожденная эритропоэтическая порфирия (СЕР), поздняя кожная порфирия (РСТ), наследственная копропорфирия (копропорфирия, или НСР), вариегатная порфирия (VP), эритропоэтическая протопорфирия (ЕРР) или транзиторная эритропорфирия детского возраста. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение представляет собой острую печеночную порфирию, например, порфирию, обусловленную недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP), AIP, НСР или VP. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой порфирию, обусловленную недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP) или AIP.

Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию, например, порфирию, выбранную из острой перемежающейся порфирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP), порфирии, обусловленной недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP) и гематоэритропоэтической порфирии. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию у гомозигот по доминантному аллелю (например, AIP, HCP или VP у гомозигот по доминантному аллелю) или гепатоэритропоэтическую порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой двойную порфирию.

Используемое в данном документе выражение "iRNA", "RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для RNAi", или "молекула iRNA" относится к средству, которое содержит РНК в том значении, в каком это выражение определено в данном документе, и которое опосредует целевое расщепление РНК-транскрипта, например, через путь с участием индуцируемого РНК комплекса сайленсинга (RISC). Согласно одному варианту осуществления iRNA, описанная в данном документе, влияет на ингибирование экспрессии ALAS1 в клетке или у млекопитающего.

Включенные в композиции iRNA, описанные в данном документе, охватывают dsRNA с нитью РНК (антисмысловой нитью), имеющей участок, например, участок, который составляет 30 нуклеотидов или менее, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, который практически комплементарен по меньшей мере части mRNA-транскрипта гена ALAS1 (например, гена ALAS1 мыши или человека) (также называемого в данном документе "iRNA, специфическая по отношению к ALAS1"). Альтернативно, или в комбинации, iRNA охватывают dsRNA с нитью РНК (антисмысловой нитью), имеющей участок, который составляет 30 нуклеотидов или менее, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, который практически комплементарен по меньшей мере части mRNA-транскрипта гена ALAS1 (например, варианта 1 или 2 гена ALAS1 человека) (также называемого в данном документе "iRNA, специфическая по отношению к ALAS1").

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA), описанная в данном документе, содержит антисмысловую нить с участком, который практически комплементарен участку ALAS1 человека. Согласно вариантам осуществления ALAS1 человека имеет последовательность NM\_000688.4 (SEQ ID NO:1) или NM\_000688.5 (SEQ ID NO:382). Согласно вариантам осуществления ALAS1 человека имеет последовательность NM\_199166.1.

Согласно вариантам осуществления антисмысловая последовательность iRNA (например, dsRNA) нацелена на участок 871-895 (плюс или минус 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотид в каком-либо одном или обоих направлениях относительно 5' и/или 3' конца) транскрипта ALAS I NM\_000688.4. Согласно вариантам осуществления антисмысловая последовательность нацелена на нуклеотиды 871-893, 871-892 или 873-895 транскрипта ALAS1 NM\_000688.4. Согласно вариантам осуществления антисмысловая последовательность содержит последовательность или состоит из последовательности, которая полностью комплементарна или практически комплементарна нуклеотидам 871-893, 871-892 или 873-895 транскрипта ALAS1 NM 000688.4.

Согласно одному аспекту представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1, антисмысловая нить которого содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем по 3, 2 или 1 нуклеотиду от последова-

тельности UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) или UAAGAUGAGACACUCTUU-CUGGU (SEQ ID NO: 4154). Согласно вариантам осуществления антисмысловая нить содержит последовательность UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) или UAAGAUGAGACACUC-TUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). Согласно вариантам осуществления смысловая нить содержит последовательность CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155). Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов антисмысловой нити и/или смысловой нити модифицированы, как описано в данном документе. Согласно вариантам осуществления dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, AD-60519 или AD-61193, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60489, AD-60519 или AD-61193 в том числе одной или нескольких (например, всех) из модификаций антисмысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489, AD-60519 или AD-61193).

Согласно одному аспекту представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1, антисмысловая нить которого содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 (например, не более чем 0, 1 или 2) нуклеотидами от антисмысловой последовательности, приведенной в любой из табл. 1-40, или немодифицированного варианта антисмысловой последовательности (например, варианте с аналогичной нуклеотидной последовательностью, за исключением того, что некоторые или все из нуклеотидов немодифицированы), приведенной в любой из табл. 21-40. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая последовательность содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 (например, не более чем 0, 1 или 2) нуклеотидами от (i) антисмысловой последовательности AD-60489, AD-60519 или AD-61193 или (ii) немодифицированного варианта любой из этих последовательностей. Согласно вариантам осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 (например, не более чем 0, 1 или 2) нуклеотидами от последовательности UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) или UAAGAU-GAGACACUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). Согласно варианту осуществления антисмысловая последовательность нацелена на положения 871-893 NM 000688.4 (SEQ ID NO:1). Согласно вариантам осуществления смысловая нить содержит последовательность CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155). Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов антисмысловой нити и/или смысловой нити модифицированы, как описано в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA не включает смысловую и/или антисмысловую последовательность, приведенную в любой из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 или 20.

Согласно одному варианту осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности РНК-транскрипту ALAS1, антисмысловая нить которого содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами, не более чем 2 нуклеотидами или не более чем одним нуклеотидом от антисмысловой последовательности AD-60519. Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов модифицированы, как описано выше.

Согласно одному варианту осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности РНК-транскрипту ALAS1, антисмысловая нить которого содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 (например, не более чем 0, 1 или 2) нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-60489 или производного AD-60489, как описано в данном документе. Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов модифицированы, как описано в данном документе, например, один или несколько (или все) нуклеотидов AD-60489 модифицированы, как описано в данном документе. Согласно вариантам осуществления производное AD-60489 представляет собой AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519 или AD-60901. Согласно вариантам осуществления производное AD-60489 представляет собой AD-60519. Согласно вариантам осуществления производное AD-60489 представляет собой AD-60519. Согласно вариантам осуществления производное AD-60489 представляет собой AD-60519. Согласно вариантам осуществления производное AD-60489 представляет собой AD-60519.

Согласно одному варианту осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности РНК-транскрипту ALAS1, антисмысловая нить которого содержит по меньшей мере 15 (например, по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 (напри-

мер, не более чем 0, 1 или 2) нуклеотидами от производного AD-58632, описанного в данном документе. Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов модифицированы, как описано в данном документе, например, один или несколько (или все) нуклеотидов AD-58632 модифицированы, как описано в данном документе. Согласно вариантам осуществления производное AD-58632 представляет собой AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60945, AD-60925, и AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, или AD-60419. Согласно вариантам осуществления производное AD-58632 представляет собой AD-60819.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется значением  $IC_{50}$ , составляющим менее 1 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется значением  $IC_{50}$  В диапазоне 0,01-1 нМ. Согласно вариантам осуществления dsRNA характеризуется значением  $IC_{50}$ , составляющим менее 0,05 нМ. Согласно вариантам осуществления dsRNA характеризуется значением  $IC_{50}$ > составляющим менее 0,02 нМ. Согласно вариантам осуществления dsRNA характеризуется значением  $IC_{50}$ , составляющим менее 0,01 нМ. Согласно вариантам осуществления  $IC_{50}$  определяют, как описано в данном документе в примерах.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется разовой дозой ED50 менее чем приблизительно 10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется разовой дозой ED50 менее чем приблизительно 5 мг/кг. Согласно вариантам осуществления EC50 определяют, как описано в данном документе в примерах.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется повышенной активностью относительно AD-58632. Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется повышенной активностью относительно AD-60489. Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA характеризуется повышенной активностью относительно AD-58632 и AD-60489.

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, или AD-60419 (например, включающую нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций упомянутых выше dsRNA). Согласно вариантам осуществления dsRNA содержит антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности (и/или одной или нескольких (например, всех) из модификаций)), выбранной из AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, или AD-60419. Согласно вариантам осуществления dsRNA содержит смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности (и/или одной или нескольких (например, всех) из модификаций)), выбранной из AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, или AD-60419.

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит последовательность или состоит из последовательности UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) или UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154), и/или (ii) смысловую нить, которая содержит последовательность или состоит из последовательности CAGAAAGAGUGUCU-CAUCUUA (SEQ ID NO: 4155). Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов антисмысловой нити и/или смысловой нити модифицированы, как описано в данном документе.

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60489 (где смысловая и/или антисмысловая последовательность включает одну или несколько (например, все) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489).

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60519, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательность или состоит из смысловой последовательность или состоит из смысловой последовательность включает одну

или несколько (например, все) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити АD-60519).

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-61193, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-61193 (где смысловая и/или антисмысловая последовательность включает одну или несколько (например, все) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-61193).

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60819, и/или (ii) смысловую последовательность, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60819 (где смысловая и/или антисмысловая последовательность включает одну или несколько (например, все) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60819).

Согласно вариантам осуществления представлена dsRNA для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819 (или соответствующей немодифицированной антисмысловой последовательности), и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819 (или соответствующей немодифицированной антисмысловой последовательности). Согласно вариантам осуществления dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819, и/или (ii) смысловую нить, которая состоит из смысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819, за исключением того, что антисмысловая нить и/или смысловая нить dsRNA отличается 1, 2 или 3 нуклеотидами от соответствующей антисмысловой и/или смысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819.

Последовательности и модификации AD-60489, AD-60519, AD-61193 и AD-60819 показаны ниже в табл. 44.

Целевые	Назван	Смысловая	Антисмысловая	Соответствующая	Соответствующая
сайты	ие дуплек	последовательность (5'-3')	последовательность (5'-3')	немодифицированна я смысловая	немодифицированна я антисмысловая
антисмыс	ca			последовательность	последовательность
ловой					
ЛОВОИ					
последов					
ательност					
и					
NM_0006					
88.4					
871-893	AD-	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuC	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfu	CAGAAAGAGUGUCUC	UAAGAUGAGACACUC
	60489	faUfcUfuAfL96 (SEQ ID NO:	UfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4157)	AUCUUA (SEQ ID NO:	UUUCUGGU (SEQ ID
		4156)		4158)	NO: 4159)
871-893	AD-	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfauc	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUf	CAGAAAGAGUGUCUC	UAAGAUGAGACACUC
	60519	uuaL96 (SEQ ID NO: 4160)	uUfcUfgsgsu (SEQ ID NO:	AUCUUA (SEQ ID NO:	UUUCUGGU (SEQ ID
			4161)	4162)	NO: 4163)
871-893	AD-	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfauc	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTu	CAGAAAGAGUGUCUC	UAAGAUGAGACACUC
	61193	uuaL96 (SEQ ID NO: 4164)	UfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4165)	AUCUUA (SEQ ID NO:	TUUCUGGU (SEQ ID
				4166)	NO: 4167)
873-895	AD-	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfauc	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucu	GAAAGAGUGUCUCAU	AAGAAGAUGAGACAC
	60819	uuCfuuL96 (SEQ ID NO:	uucsusg (SEQ ID NO: 4169)	CUUCUU (SEQ ID NO:	UCUUUCUG (SEQ ID
		4168)		4170)	NO: 4171)

Таблица 44. Последовательности и модификации AD-60489, AD-60519, AD-61193, AD-60819

где c, a, g, u = 2'-ОМе рибонуклеозиды; Af, Cf, G, Uf = 2'F рибонуклеозиды;  $S = \phi$ осфотиоат; L96 имеет структуру, обозначенную в табл. 1.

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, AD-60519 или AD-61193, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60489, AD-60519 или AD-61193 (в том числе нуклеотидной последовательности и одной или нескольких (например, всех) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489, AD-60519 или AD-61193).

Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA)

для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA представляет собой AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819. Согласно вариантам осуществления представлена двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA представляет собой AD-60489, AD-60519 или AD-61193 (например, в том числе нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций AD-60489, AD-60519 или AD-61193).

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой AD-60489, содержит AD-60489 или состоит из AD-60489 (например, в том числе нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций AD-60489).

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой AD-60519, содержит AD-60519 или состоит из AD-60519 (например, в том числе нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций AD-60519).

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой AD-61193, содержит AD-61193 или состоит из AD-61193 (например, в том числе нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций AD-61193).

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой AD-60819, содержит AD-60819 или состоит из AD-60819 (например, в том числе нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций AD-60819).

Согласно вариантам осуществления dsRNA (например, AD-60489, AD-60519, AD-61193, AD-60819 или другая dsRNA, раскрытая в данном документе в любой из табл. 21-40) является эффективной для подавления уровня mRNA ALAS1 в печени, например, для достижения сайленсинга по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% (например, так, чтобы уровни mRNA ALAS1 снижены до 90% или менее, 80% или менее, 70% или менее, 60% или менее, 50% или менее, 40% или менее, 30% или менее или 20% или менее относительно контрольного уровня mRNA ALAS1 в печени, например, уровня у индивида, не получавшего лечение, или группы индивидов, например, индивида или группы индивидов, получавших лечение только PBS). Согласно вариантам осуществления эффективность dsRNA в отношении подавления уровня mRNA ALAS1 в печени оценивают с применением модели на низших приматах, например, описанной в данном документе в примерах.

Согласно вариантам осуществления dsRNA (например, AD-60489, AD-60519, AD-61193, AD-60819 или другая dsRNA, раскрытая в данном документе в любой из табл. 21-40) является эффективной для подавления уровня циркулирующей mRNA ALAS1, например, для достижения сайленсинга по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% (например, так, чтобы уровни mRNA ALAS1 снизились до 90% или менее, 80% или менее, 70% или менее, 60% или менее, 50% или менее, 40% или менее, 30% или менее, нее или 20% или менее относительно контрольного уровня циркулирующей mRNA ALAS1, например, уровня, который наблюдался до лечения dsRNA или уровня у не получавшего лечения индивида или группы индивидов). Согласно вариантам осуществления эффективность dsRNA в отношении подавления уровня циркулирующей mRNA ALAS1 оценивают с применением модели на низших приматах, например, описанной в данном документе в примерах. Согласно вариантам осуществления уровень циркулирующей mRNA ALAS1 оценивают с применением анализа по выявлению циркулирующей внеклеточной PHK (cERD), например, как описано в данном документе или в Sehgal A. et al. Quantitation of tissuespecific target gene modulation using circulating RNA (постер, представленный 9 февраля 2012 г. на симпозиуме Keystone Gene Silencing by small RNAs (Ванкувер, 7-12 февраля, 2012 г.) или Sehgal A. et al. Tissuespecific gene silencing monitored in circulating RNA, RNA, 20: 1-7, опубликованном в Интернете 19 декабря 2013 г.

Способ сERD можно применять относительно любого соответствующего биологического образца. Согласно вариантам осуществления уровень циркулирующей mRNA ALAS1 оценивают с применением образца крови, например, образца сыворотки. Согласно вариантам осуществления уровень циркулирующей mRNA ALAS1 оценивают с применением образца мочи.

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой производное AD-60489, раскрытой в данном документе, например, в любой из табл. в данном документе. Согласно вариантам осуществления dsRNA характеризуется повышенной активностью относительно AD-60489. Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA представляет собой AD-60519.

Согласно вариантам осуществления dsRNA представляет собой производное AD-58632, раскрытой в данном документе, например, в любой из табл. в данном документе. Согласно вариантам осуществления dsRNA характеризуется повышенной активностью относительно AD-58632.

Согласно вариантам осуществления на повышенную активность указывает более низкое значение  $IC_{50}$ , например, как определено на основании анализов in vitro, например, описанных в данном документе, например, в примерах.

Согласно вариантам осуществления на повышенную активность указывает более низкая эффективная доза. Эффективную дозу можно определить на основе введения разовой дозы или нескольких повторяющихся доз. Согласно вариантам осуществления эффективную дозу определяют на основе разовой дозы ED50. Согласно вариантам осуществления эффективную дозу или разовую дозу ED50 определяют на основе in vivo анализа. Согласно вариантам осуществления in vivo анализ проводят для низшего жи-

вотного, например, для крысы, для низшего примата или для мыши.

Согласно вариантам осуществления эффективную дозу определяют на основе дозы, необходимой для получения снижения уровня mRNA ALAS1 (например, уровня mRNA ALAS1 в печени и/или уровня циркулирующей mRNA ALAS1), например, как описано в данном документе в примерах. Согласно вариантам осуществления циркулирующую mRNA оценивают с применением анализа cERD.

Согласно вариантам осуществления эффективную дозу определяют на основе дозы, требуемой для получения снижения уровня (например, уровня в моче и/или плазме) ALA и/или PBG.

Согласно вариантам осуществления эффективную дозу определяют на основе дозы, требуемой для получения конкретного лечебного эффекта, описанного в данном документе, например, предупреждения или облегчения симптомов, связанных с порфирией.

Согласно вариантам осуществления на повышенную активность указывает достижение более высокого уровня dsRNA в печени. Согласно вариантам осуществления более высокий уровень в печени получают после разовой дозы dsRNA (например, дозы по 1, 2,5, 3, 5 или 10 мг/кг). Согласно вариантам осуществления более высокий уровень в печени получают после введения нескольких доз dsRNA (например, 2-10 ежедневных или еженедельных доз по 1, 2,5, 3, 5 или 10 мг/кг).

Согласно одному варианту осуществления iRNA охватывает dsRNA с нитью РНК (антисмысловой нитью), имеющей участок, который практически комплементарен части mRNA ALAS1, например, mRNA ALAS1 человека (например, mRNA ALAS1 человека, представленной под SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO: 382).

Согласно одному варианту осуществления iRNA для ингибирования экспрессии гена ALAS1 включает по меньшей мере две последовательности, которые комплементарны друг другу. iRNA включает смысловую нить с первой последовательностью и антисмысловую нить со второй последовательностью. Антисмысловая нить включает нуклеотидную последовательность, которая практически комплементарна по меньшей мере части mRNA, кодирующей транскрипт ALAS1, и при этом участок комплементарности составляет 30 нуклеотидов или менее, и по меньшей мере 15 нуклеотидов в длину. Как правило, iRNA составляет 19-24 нуклеотида в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составляет 19-21 нуклеотид в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составляет 19-21 нуклеотид в длину и находится в липидном составе, например, составе на основе липидных наночастиц (LNP) (например, составе LNP11).

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составляет 21-23 нуклеотида в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составляет 21-23 нуклеотида в длину и находится в форме конъюгата, например, конъюгата с одним или несколькими производными GalNAc, описанными в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 25 нуклеотидов в длину, и согласно другим вариантам осуществления iRNA составляет от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину. iRNA, нацеленная на ALAS1, при контакте с клеткой, экспрессирующей ALAS1, ингибирует экспрессию гена ALAS1 по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35% или по меньшей мере на 40% или более, например, при анализе с помощью способа, описанного в данном документе. Согласно одному варианту осуществления iRNA, нацеленная на ALAS1, составлена как компонент стабильной частицы нуклеиновая кислота-липид (SNALP).

Согласно одному варианту осуществления iRNA (например, dsRNA), описанная в данном документе, включает первую последовательность dsRNA, которую выбирают из группы, состоящей из смысловых последовательностей из табл. 21-40, и вторую последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из соответствующих антисмысловых последовательностей из табл. 21-40.

Молекулы iRNA, описанные в данном документе, могут включать встречающиеся в природе нуклеотиды или могут включать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. Согласно вариантам осуществления по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает одну или несколько из модификаций нуклеотида, выбранных из группы, состоящей из запертой нуклеиновой кислоты (LNA), ациклического нуклеотида, гекситной или гексозной нуклеиновой кислоты (HNA), циклогексеновой нуклеиновой кислоты (CeNA), 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'дезокси, 2'-гидроксила или любой их комбинации. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает без ограничения 2'-О-метилодифицированный нуклеотид, 2'-фтормодифицированный нуклеотид, нуклеотид с 5'-фосфотиоатной группой, и концевой нуклеотид, связанный с лигандом, например, N-ацетилгалактозамином (GalNAc) или производным холестерила. Альтернативно, модифицированный нуклеотид можно выбрать из группы: 2'-дезокси-2'-фтормодифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, ациклического нуклеотида, нуклеотида с удаленными основаниями, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-алкилмодифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего не встречающиеся в природе основания. Такая модифицированная последовательность может быть основана, например, на первой последовательности упомянутой iRNA, выбранной из группы, состоящей из смысловых последовательностей, раскрытых в табл. 21-40, и второй последовательности, выбранной из группы, состоящей из соответствующих антисмысловых последовательностей, раскрытых в табл.1-40.

Согласно одному варианту осуществления iRNA, описанная в данном документе, нацелена на вариант PHK-транскрипта ALAS1 дикого типа, и согласно другому варианту осуществления iRNA нацелена на мутантный транскрипт (например, PHK ALAS1, несущей аллельный вариант). Например, iRNA, описанная в настоящем изобретении, может быть нацелена на полиморфный вариант, такой как однонуклеотидный полиморфизм (SNP) ALAS1. Согласно другому варианту осуществления iRNA нацелена на транскрипт ALAS1 как дикого, так и мутантного типа. Согласно еще одному варианту осуществления iRNA нацелена на конкретный вариант транскрипта ALAS1 (например, вариант 1 ALAS1 человека). Согласно еще одному варианту осуществления средство на основе iRNA нацелено на несколько вариантов транскриптов (например, как вариант 1, так и вариант 2 ALAS1 человека).

Согласно одному варианту осуществления iRNA, описанная в данном изобретении, нацелена на некодирующий участок РНК-транскрипта ALAS1, такой как 5' или 3' нетранслируемый участок транскрипта

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA, описанная в данном документе, находится в форме конъюгата, например, углеводного конъюгата, который может выполнять роль целевого фрагмента и/или лиганда, описанного в данном документе. Согласно одному варианту осуществления конъюгат присоединен к 3'-концу смысловой нити dsRNA. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат присоединен с помощью линкера, например, с помощью двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат содержит одну или несколько производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Такой конъюгат также называется в данном документе конъюгат GalNAc. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат нацеливает средство для RNAi на конкретную клетку, например клетку печени, например гепатоцит. Производные GalNAc могут быть присоединены с помощью линкера, например, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно конкретным вариантам осуществления конъюгат представляет собой

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi присоединено к углеводному конъюгату с помощью линкера, например линкера, как показано в следующей схеме, где X представляет собой O или S

Согласно некоторым вариантам осуществления X представляет собой О. Согласно некоторым вариантам осуществления X представляет собой S.

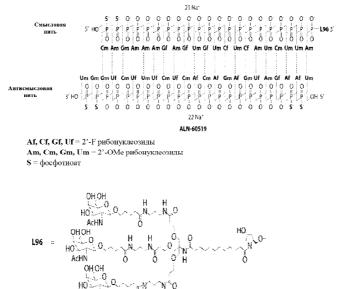
Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi конъюгировано с L96, как определено в табл. 1 и показано ниже.

Согласно одному варианту осуществления dsRNA характеризуется одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью, одиннадцатью, двенадцатью, тринадцатью, четырнадцатью, пятнадцатью, шестнадцатью или всем из следующего:

(i) синтезирована химическим путем, например синтезирована с помощью твердофазного синтеза олигонуклеотидов;

- (ii) все нуклеотиды в dsRNA модифицированы, например все нуклеотиды являются 2'-ОМе или 2'-F-модифицированными, или представляют собой комбинацию из 2'-ОМе и 2'-F-модифицированных;
  - (iii) все нуклеотиды связаны 3'-5' фосфодиэфирными связями;
  - (iv) смысловая нить содержит 21 нуклеотид или состоит из 21 нуклеотида;
  - (v) антисмысловая нить содержит 23 нуклеотида или состоит из 23 нуклеотидов;
  - (vi) имеет тупой конец на 3'-конце смысловой нити;
- (vii) имеет 3'-выступающий конец, например имеет выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити;
- (viii) присоединена ковалентными связями к лиганду, содержащему три фрагмента N-ацетилгалактозамина (GalNAc);
- (ix) 3'-конец смысловой нити конъюгирован с фрагментом GalNAc с тремя разветвлениями (например, называемым в данном документе L96, как определено в табл.1). Согласно одному варианту осуществления 3'-конец присоединен к фрагменту GalNAc с тремя разветвлениями при помощи фосфодиэфирной связи;
- (x) имеет антисмысловую нить, которая содержит одну или несколько (например, четыре) фосфотиоатных связей. Согласно одному варианту осуществления фосфотиоатные связи расположены на 3' конце и на 5' конце антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления две фосфотиоатные связи расположены на 3' конце и две фосфотиоатные связи расположены на 5' конце антисмысловой нити:
- (хі) имеет смысловую нить, которая содержит одну или несколько (например, две) фосфотиоатных связей. Согласно одному варианту осуществления одна или несколько (например, две) фосфотиоатных связей расположены на 5' конце смысловой нити;
- (xii) 21 нуклеотид смысловой нити гибридизируется с комплементарным 21 нуклеотидом антисмысловой нити;
- (хііі) образует 21 пару нуклеотидных оснований и выступающий конец из двух оснований на 3'-конце антисмысловой нити;
- (xiv) содержит смысловую или антисмысловую нить или состоит из смысловой или антисмысловой нити с последовательностью AD-60519;
- (xv) имеет смысловую нить с 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20 или всеми из модификаций смысловой нити AD-60519;
- (xvi) имеет антисмысловую нить с 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20 или всеми из модификаций антисмысловой нити AD-60519; или
  - (xvii) имеет последовательность дуплекса и все модификации AD-60519.

Согласно вариантам осуществления dsRNA находится в форме конъюгата следующей структуры (также называемой в данном документе AD-60519 или ALN-60519) (SEQ ID NOS 5238-5239 соответственно, по порядку):



Согласно одному аспекту в данном документе представлена композиция, например фармацевтическая композиция, которая включает одну или несколько из iRNA, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или средство доставки. Согласно одному варианту осуществления композиция применяется для ингибирования экспрессии гена ALAS1 в организме, как правило, у человека. Согласно одному варианту осуществления композиция применяется для лечения порфирии, например AIP.

Согласно одному аспекту iRNA, представленная в данном документе, представляет собой двунитевую рибонуклеиновую кислоту (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить из 15-30 пар оснований в длину, и антисмысловая нить комплементарна по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам под SEQ ID NO: 1 или 382.

Согласно дополнительному аспекту iRNA, представленная в данном документе, представляет собой двунитевую RNAi (dsRNA), содержащую смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где упомянутая антисмысловая нить содержит участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1, где каждая нить имеет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где упомянутое средство для двунитевой RNAi представлено формулой (III):

смысловая:

5'  $n_p$  - $N_a$  -(X X X)<sub>i</sub>- $N_b$  -Y Y Y - $N_b$  -(Z Z Z)<sub>j</sub> - $N_a$  -  $n_q$  3'

антисмысловая:

3'  $n_p$ '- $N_a$ '- $(X'X'X')_k$ - $N_b$ '-Y'Y'Y'- $N_b$ '- $(Z'Z'Z')_l$ - $N_a$ '-  $n_q$ ' 5'

(III)

где

каждый из і, ј, k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из р, р', q и q' независимо равняется 0-6;

каждый  $N_a$  и  $N_a$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  и  $N_b$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый  $n_p, n_p', n_q$  и  $n_q'$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации Y, а модификации  $N_b$  отличаются от модификации Y'.

Согласно вариантам осуществления смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

Согласно вариантам осуществления і равняется 1;

ј равняется 1, или

как і, так и ј равняются 1.

Согласно вариантам осуществления k равняется 1; l равняется 1, или как k, так и l равняются l.

Согласно вариантам осуществления XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y', а ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

Согласно вариантам осуществления мотив Y'Y'Y' находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой нити от 5'-конца.

Согласно вариантам осуществления У' представляет собой 2'-О-метил.

Согласно вариантам осуществления участок дуплекса составляет 15-30 пар нуклеотидов в длину.

Согласно вариантам осуществления участок дуплекса составляет 17-23 пары нуклеотидов в длину.

Согласно вариантам осуществления участок дуплекса составляет 19-21 пары нуклеотидов в длину.

Согласно вариантам осуществления участок дуплекса составляет 21-23 пары нуклеотидов в длину.

Согласно вариантам осуществления модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из запертой нуклеиновой кислоты (LNA), ациклического нуклеотида, гекситной или гексозной нуклеиновой кислоты (HNA), циклогексеновой нуклеиновой кислоты (CeNA), 2'-метоксиэтил, 2'-О-алкил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-фтор, 2'-дезокси, 2'-гидроксил и любой их комбинации.

Согласно вариантам осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезокси, 2'-гидроксила и их комбинаций.

Согласно вариантам осуществления модификациями нуклеотидов являются 2'-О-метил-, 2'-фтор или обе.

Согласно вариантам осуществления лиганд содержит углевод.

Согласно вариантам осуществления лиганд присоединен с помощью линкера.

Согласно вариантам осуществления линкер является двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером.

Согласно вариантам осуществления лиганд представляет собой

Согласно вариантам осуществления лиганд и линкер показаны в формуле XXIV

Согласно вариантам осуществления лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити.

Согласно вариантам осуществления dsRNA состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы последовательностей, представленных в табл. 21-40.

Согласно дополнительному аспекту представленная в данном документе iRNA представляет собой двунитевую рибонуклеиновую кислоту (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, антисмысловая нить содержит участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1, эта антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 21-40. Согласно вариантам осуществления нуклеотиды антисмысловой нити имеют меньше модификаций, больше модификаций или другие модификации относительно антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл.21-40.

Согласно вариантам осуществления смысловые и антисмысловые последовательности являются последовательностями дуплекса, раскрытого в данном документе, который подавляет экспрессию mRNA ALAS1 по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85 или 90%, например, при оценке с применением анализа, раскрытого в примерах, представленных в данном документе.

Согласно вариантам осуществления экспрессию mRNA ALAS1 оценивают исходя из уровня mRNA ALAS1 в печени, например, при оценке с применением образца для биопсии печени. Согласно вариантам осуществления экспрессию mRNA ALAS1 оценивают исходя из уровня mRNA ALAS1 в биологической жидкости, например, крови, сыворотке, плазме, спинномозговой жидкости или моче. Согласно вариантам осуществления уровень экспрессии mRNA ALAS1 оценивают с применением анализа по выявлению внеклеточной PHK в кровотоке (cERD), например, анализа cERD, описанного в данном документе или в Sehgal, A. et al. Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA (постер, представленный 9 февраля 2012 г. на симпозиуме Keystone Gene Silencing by small RNAs (Ванкувер, 7-12 февраля, 2012 г.) или Sehgal, A. et al. Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA, RNA, 20: 1-7, опубликованном в Интернете 19 декабря 2013 г.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, и концевого нуклеотида, присоединенного к группе производного холестерила или бисдециламида додекановой кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезокси-2'-фтормодифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, ациклического нуклеотида, нуклеотида с удаленными основаниями, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-алкилмодифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего не встречающиеся в природе основания.

Согласно некоторым вариантам осуществления участок комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления участок комплементарности составляет 19-21 нуклеотид в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления участок комплементарности составляет 19 нуклеотидов в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления каждая нить составляет не более 30 нуклеотидов в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'- выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно вариантам осуществления антисмысло-

вая нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов. Согласно вариантам осуществления антисмысловая нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов. Согласно вариантам осуществления антисмысловая нить содержит 3'-выступающий конец из 2 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA, описанная в данном документе, дополнительно содержит лиганд.

Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд представляет собой лиганд GalNAc.

Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд нацеливает dsRNA в гепатоциты.

Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити dsRNA.

Согласно некоторым вариантам осуществления участок комплементарности состоит из антисмысловой последовательности, выбранной из антисмысловых последовательностей, приведенных в табл.21-40, или соответствующей антисмысловой последовательности, в которой некоторые или все из нуклеотидов немодифицированы. Согласно вариантам осуществления участок комплементарности состоит из последовательности UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) или UAAGAUGAGACA-CUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). Согласно некоторым вариантам осуществления участок комплементарности состоит из антисмысловой последовательности дуплекса AD-60489. Согласно некоторым вариантам осуществления участок комплементарности состоит из антисмысловой последовательности дуплекса AD-60519.

Согласно вариантам осуществления участок комплементарности состоит из антисмысловой последовательности, выбранной из дуплекса, раскрытого в данном документе, который подавляет экспрессию mRNA ALAS1 по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85 или 90%, например, как определено с помощью анализа, раскрытого в примерах, представленных в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA содержит смысловую нить, состоящую из последовательности смысловой нити, выбранной из табл. 21-40, и антисмысловой нити, состоящей из антисмысловой последовательности, выбранной из табл. 21-40. Согласно вариантам осуществления dsR-NA содержит пару соответствующих смысловой и антисмысловой последовательностей, выбранных из таковых дуплексов, раскрытых в табл. 21-40.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение представляет клетку, содержащую по меньшей мере одну из iRNA (например, dsRNA), описанную в данном документе. Клетка, как правило, представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой эритроидную клетку. Согласно другим вариантам осуществления клетка представляет собой клетку печени (например, гепатоцит).

Согласно одному аспекту в данном документе представлена фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена ALAS1, при этом композиция содержит iRNA (например, dsRNA), описанную в данном документе.

Согласно вариантам осуществления фармацевтических композиций, описанных в данном документе, iRNA (например, dsRNA) вводят в составе безбуферного раствора.

Согласно вариантам осуществления безбуферным раствором является солевой раствор или вода, например вода для инъекций.

Согласно вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит AD-60519 и воду для инъекций. Согласно вариантам осуществления композиция содержит приблизительно 100-300 мг/мл, например 200 мг/мл AD-60519. Согласно вариантам осуществления композиции характеризуются рН 6,0-7,5, например приблизительно 7,0. Согласно вариантам осуществления композиция предназначена для подкожной инъекции. Согласно вариантам осуществления фармацевтическую композицию фасуют в упаковку (например, стеклянный флакон, например, 2 мл стеклянный флакон) объемом приблизительно 0,3-1 мл, например 0,55 мл. Согласно вариантам осуществления фармацевтическая композиция представляет собой ALN-AS1, описанную в данном документе в примерах.

Согласно вариантам осуществления фармацевтических композиций, описанных в данном документе, iRNA (например, dsRNA) вводят с буферным раствором. Согласно вариантам осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. Согласно вариантам осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS).

Согласно вариантам осуществления фармацевтических композиций, описанных в данном документе, iRNA (например, dsRNA) нацелена на гепатоциты.

Согласно вариантам осуществления фармацевтических композиций, описанных в данном документе, композицию вводят внутривенно.

Согласно вариантам осуществления фармацевтических композиций, описанных в данном документе, композицию вводят подкожно.

Согласно вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит iRNA (например, dsRNA), описанную в данном документе, которая содержат лиганд (например, лиганд, представляющий

собой GalNAc), который нацеливает iRNA (например, dsRNA) в гепатоциты.

Согласно вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит iRNA (например, dsRNA), описанную в данном документе, которая содержат лиганд (например, лиганд, представляющий собой GalNAc), и при этом фармацевтическую композицию вводят подкожно. Согласно вариантам осуществления лиганд нацеливает iRNA (например, dsRNA) в гепатоциты.

Согласно определенным вариантам осуществления фармацевтическая композиция, например композиция, описанная в данном документе, включает липидный состав. Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi представляет собой состав LNP, например состав MC3. Согласно некоторым вариантам осуществления состав LNP нацеливает средство для RNAi в конкретную клетку, например, клетку печени, например, гепатоцит. Согласно вариантам осуществления липидный состав представляет собой состав LNP11. Согласно вариантам осуществления композицию вводят внутривенно.

Согласно другому варианту осуществления фармацевтическая композиция составлена для введения согласно схеме дозирования, описанной в данном документе, например, не более одного раза каждые четыре недели, не более одного раза каждые три недели, не более одного раза каждые две недели или не более одного раза каждую неделю. Согласно другому варианту осуществления введение фармацевтической композиции может продолжаться в течение месяца или дольше, например, одного, двух, трех или шести месяцев, или одного года или дольше.

Согласно другому варианту осуществления композицию, содержащую iRNA, описанную в настоящем изобретении, например dsRNA, нацеленную на ALAS1, вводят с терапевтическим средством без iRNA, как например, средством, известным для лечения порфирии (например, AIP) или симптома порфирии (например, болевых ощущений). Согласно другому варианту осуществления композицию, содержащую iRNA, описанную в настоящем изобретении, например, dsRNA, нацеленную на AIP, вводят в сочетании со схемой лечения для средства без iRNA, такого как гемин или глюкоза (например, инфузия глюкозы (например, IV глюкозы)). Например, iRNA, описанную в настоящем изобретении, можно вводить до, после или одновременно с глюкозой, декстрозой или подобным лечением, которое помогает восстановить энергетический баланс (например, полное парентеральное питание). iRNA, описанную в настоящем изобретении, можно также вводить до, после или одновременно с введением препарата на основе гема (например, гемина, аргината гема или гемальбумина), а также необязательно в комбинации с глюкозой (например, IV глюкозой) или т.п.

Как правило, глюкозу, вводимую для лечения порфирии, вводят внутривенно (IV). Внутривенное введение глюкозы называют в данном документе "IV глюкозой." Однако, также охвачены альтернативные варианты осуществления, согласно которым глюкозу вводят другими способами.

Согласно одному варианту осуществления iRNA ALAS1 вводят пациенту, а затем пациенту назначают схему введения средства или лечебного средства, не содержащего iRNA (например, глюкозы и/или препарата на основе гема) (или наоборот). Согласно другому варианту осуществления iRNA ALAS1 и терапевтическое средство без iRNA или схему лечения назначают в одно и то же время.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ ингибирования экспрессии ALAS1 в клетке, при этом способ включает:

(a) введение в клетку iRNA (например, dsRNA), описанной в данном документе, и (b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для обеспечения разрушения mRNA-транскрипта гена ALAS1, вследствие чего происходит ингибирование экспрессии гена ALAS1 в клетке.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ снижения или ингибирования экспрессии гена ALAS1 в клетке (например, эритроидной клетке или клетке печени, такой как, например, гепатоцит).

#### Способ включает:

- (а) введение в клетку двунитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), где dsRNA включает по меньшей мере две последовательности, которые комплементарны друг другу. dsRNA содержит смысловую нить с первой последовательностью и антисмысловую нить со второй последовательностью; антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который практически комплементарен по меньшей мере части mRNA, кодирующей ALAS1, и при этом участок комплементарности составляет 30 нуклеотидов или менее, например 15-30 нуклеотидов в длину, и, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, и где dsRNA при контакте с клеткой, экспрессирующей ALAS1, ингибирует экспрессию гена ALAS1 по меньшей мере на 10%, например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или более; и
- (b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для обеспечения разрушения mRNA-транскрипта гена ALAS1, вследствие чего происходит снижение или ингибирование экспрессии гена ALAS1 в клетке.

Согласно вариантам осуществления изложенных выше способов ингибирования экспрессии ALAS1 в клетке, клетку обрабатывают ех vivo, in vitro или in vivo. Согласно вариантам осуществления клетка представляет собой гепатоцит.

Согласно вариантам осуществления клетка принадлежит субъекту, нуждающемуся в лечении, предупреждении и/или контроле нарушения, связанного с экспрессией ALAS1. Согласно вариантам осуществления нарушение представляет собой порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой острую перемежающуюся порфирию или порфирию, обусловленную недостаточностью дегидратазы ALA.

Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию, например, порфирию, выбранную из острой перемежающейся порфирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP), порфирии, обусловленная недостаточностью дегидратазы ALA (ADP), и гематоэритропоэтической порфирии. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию у гомозигот по доминантному аллелю (например, AIP, HCP или VP у гомозигот по доминантному аллелю) или гепатоэритропоэтическую порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой двойную порфирию.

Согласно вариантам осуществления экспрессию ALAS1 ингибируют по меньшей мере на 30%.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) характеризуется значением  $IC_{50}$  В диапазоне 0,01-1 нМ.

Согласно определенным вариантам осуществления клетка (например, гепатоцит) представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека, низшего примата или грызуна).

Согласно одному варианту осуществления клетку обрабатывают ex vivo, in vitro или in vivo (например, клетка принадлежит субъекту (например, пациенту, нуждающемуся в лечении, предупреждении и/или контроле нарушения, связанного с экспрессией ALAS1)).

Согласно одному варианту осуществления субъект представляет собой млекопитающее (например, человека) с риском возникновения порфирии, или диагностированной порфирией, например, Х-сцепленной сидеробластической анемией (XLSA), порфирией, обусловленной недостаточностью дегидратазы ALA (ADP или порфирией Досса), острой перемежающейся порфирией (AIP), врожденной эритропоэтической порфирией (СЕР), поздней кожной порфирией (РСТ), наследственной копропорфирией (копропорфирией, или НСР), вариегатной порфирией (VP), эритропоэтической протопорфирией (ЕРР) или транзиторной эритропорфирией детского возраста. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение представляет собой острую печеночную порфирию, например, порфирию, обусловленную недостаточностью дегидратазы ALA (ADP), AIP, НСР или VP. Согласно конкретным вариантам осуществления нарушение представляет собой порфирию, обусловленную недостаточностью дегидратазы ALA (ADP) или AIP.

Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию, например, порфирию, выбранную из острой перемежающейся порфирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP), порфирии, обусловленная недостаточностью дегидратазы ALA (ADP), и гематоэритропоэтической порфирии. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию у гомозигот по доминантному аллелю (например, AIP, HCP или VP у гомозигот по доминантному аллелю) или гепатоэритропоэтическую порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой двойную порфирию.

Согласно одному варианту осуществления введенная dsRNA снижает или ингибирует экспрессию гена ALAS1 в клетке.

Согласно одному варианту осуществления введенная dsRNA снижает или ингибирует экспрессию гена ALAS1 или уровень одного или нескольких порфиринов или предшественников порфиринов (например, 8-аминолевулиновой кислоты (ALA), порфобилиногена (PBG), гидроксиметилбилана (HMB), уропорфириногена I или III, копропорфириногена I или III, протопорфириногена IX и протопорфирина IX) или продуктов или метаболитов порфирина по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% или более относительно эталонного образца (например, необработанной клетки или клетки, обработанной нецелевой контрольной dsRNA). Без привязки к конкретной теории, ALAS1 является первым ферментом в рамках порфиринового пути. Таким образом, снижение экспрессии гена ALAS1, по-видимому, снижает уровень одного или нескольких предшественников порфиринов, порфиринов или продуктов или метаболитов порфиринов.

Согласно другим аспектам в настоящем изобретении представлены способы лечения, предупреждения или контроля патологических процессов, связанных с экспрессией ALAS1 (например, патологических процессов, в которые вовлечены порфирины, предшественники порфиринов, или нарушения в рамках порфиринового пути, как например, порфирии). Согласно одному варианту осуществления способ включает введение субъекту, например, пациенту, нуждающемуся в таком лечении, предупреждении или контроле, эффективного (например, терапевтически или профилактически эффективного) количества одного или нескольких из iRNA, описанных в данном документе.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ лечения и/или предупреждения нарушения, связанного с экспрессией ALAS1, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества iRNA (например, dsRNA), описанной в данном документе, или композиции, содержащей iRNA (например, dsRNA), описанной в данном документе.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ лечения и/или предупреждения порфирии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, двунитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить из 15-

30 пар оснований в длину, и при этом антисмысловая нить комплементарна по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам под SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO: 382.

Согласно одному варианту осуществления субъект (например, пациент) страдает порфирией. Согласно другому варианту осуществления субъект (например, пациент) подвержен риску развития порфирии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение iRNA, нацеленной на ALAS1, ослабляет или облегчает у пациента тяжесть по меньшей мере одного симптома нарушения, связанного с ALAS1.

Согласно одному варианту осуществления субъект представляет собой млекопитающее (например, человека) с риском возникновения нарушения, связанного с экспрессией ALAS1, или диагностированным нарушением, связанным с экспрессией ALAS1, например порфирией, например, X-сцепленной сидеробластической анемией (XLSA), порфирией, обусловленной недостаточностью ALA-дегидратазы (порфирией Досса), острой перемежающейся порфирией (AIP), врожденной эритропоэтической порфирией (СЕР), поздней кожной порфирией (РСТ), наследственной копропорфирией (копропорфирией, или НСР), вариегатной порфирией (VP), эритропоэтической протопорфирией (ЕРР) или транзиторной эритропорфирией детского возраста. Согласно дополнительному варианту осуществления порфирия представляет собой острую печеночную порфирию, например, порфирию, обусловленную недостаточностью дегидратазы ALA (ADP), AIP, НСР или VP. Согласно некоторым таким вариантам осуществления нарушение представляет собой порфирию, обусловленную недостаточностью дегидратазы ALA (ADP) или AIP.

Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию, например, порфирию, выбранную из острой перемежающейся порфирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP), порфирии, обусловленной недостаточностью дегидратазы ALA (ADP), и гематоэритропоэтической порфирии. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию у гомозигот по доминантному аллелю (например, AIP, HCP или VP у гомозигот по доминантному аллелю) или гепатоэритропоэтическую порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой двойную порфирию.

Согласно вариантам осуществления порфирию, симптом порфирии, продром или приступ порфирии индуцирован воздействием провоцирующего фактора, описанного в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления провоцирующим фактором является химическое воздействие. Согласно некоторым вариантам осуществления провоцирующим фактором является лекарственное средство, например, лекарственное средство рецептурного отпуска или отпускаемое без рецепта лекарственное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления провоцирующим фактором является менструальный цикл, например, конкретная фаза менструального цикла, например, лютеиновая фаза.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят после острого приступа порфирии.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят во время острого приступа порфирии.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят профилактически с целью предупреждения острого приступа порфирии.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) составлена в виде состава LNP.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) находится в форме конъюгата Gal-NAc.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) вводят в дозе 0,05-50 мг/кг.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) вводят в концентрации 0,01-5 мг/кг веса тела субъекта.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) составлена в виде состава LNP и его вводят в дозе 0.05-5 мг/кг.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) составлена в форме конъюгата Gal-NAc и его вводят в дозе 0,5-50 мг/кг. Согласно определенным вариантам осуществления iRNA в конъюгате GalNAc вводят в дозе менее 10 мг/кг (например, 5 мг/кг или менее), например, один раз в неделю; например, в дозе 1 мг/кг или менее, 2,5 мг/кг или менее, или 5 мг/кг или менее, например, один раз в неделю. Согласно одному варианту осуществления iRNA в конъюгате GalNAc вводят в дозе приблизительно 2,5 мг/кг или менее, например, один раз в неделю. Согласно одному варианту осуществления введение iRNA в конъюгате GalNAc представляет собой подкожное введение.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) составлена в форме конъюгата Gal-NAc и его вводят, например, подкожно, в дозе 0-5 мг/кг, например, 0-2,5 мг/кг или 1-2,5 мг/кг. Согласно вариантам осуществления iRNA вводят еженедельно. Согласно вариантам осуществления iRNA вводят в виде композиции, содержащей iRNA и воду для инъекции. Согласно вариантам осуществления iRNA представляет собой AD-60519. Согласно вариантам осуществления композиция содержит iRNA, например AD-60519, в концентрации приблизительно 200 мг/мл.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа снижают уровень порфирина или предшественника порфирина у субъекта.

Согласно вариантам осуществления уровень снижают по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%. Согласно варианту осуществления уровень снижают по меньшей мере на 30%.

Согласно вариантам осуществления предшественником порфирина является 5-аминолевулиновая кислота (ALA) или порфобилиноген (PBG).

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) характеризуется значением  $IC_{50}$  в диапазоне 0.01-1 нМ.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа, описанного в данном документе,

- (i) облегчают симптом, ассоциированный с нарушением, связанным с ALAS1 (например, порфирией),
  - (ii) ингибируют экспрессию ALAS1 у субъекта (например, при оценке с помощью анализа cERD),
- (iii) снижают уровень предшественника порфирина (например, ALA или PBG) или порфирина у субъекта,
  - (iv) снижают частоту острых приступов симптомов, ассоциированных с порфирией, у субъекта, или
- (v) снижает у субъекта частоту острых приступов симптомов, ассоциированных с порфирией, при воздействии в отношении субъекта провоцирующего фактора (например, предменструальной фазы или лютеиновой фазы).

Согласно вариантам осуществления с помощью способа облегчают болевые ощущения и/или прогрессирующую нейропатию.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят согласно схеме дозирования.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят до или во время острого приступа порфирии.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят до острого приступа порфирии.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят во время продрома. Согласно вариантам осуществления продром характеризуется болью в животе, тошнотой, психологическими симптомами (например, тревожностью), возбужденным состоянием и/или бессонницей.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят во время конкретной фазы менструального цикла, например, во время лютеиновой фазы.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа облегчают или предупреждают периодические приступы порфирии, например, путем снижения тяжести, продолжительности или частоты приступов. Согласно вариантам осуществления периодические приступы ассоциированы с провоцирующим фактором. Согласно вариантам осуществления провоцирующим фактором является менструальный цикл, например, конкретная фаза менструального цикла, например, лютеиновая фаза.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет повышенный уровень ALA и/или PBG. Согласно вариантам осуществления уровень ALA и/или PBG повышен в плазме или моче субъекта. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например, печеночной порфирии. Согласно вариантам осуществления у субъекта не наблюдаются симптомы. Согласно вариантам осуществления субъект имеет генетическое изменение (например, мутацию гена), ассоциированное с порфирией, как описано в данном документе. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии и испытывает болевые ощущения (например, хроническую боль, например, хроническую нейропатическую боль) и/или нейропатию (например, прогрессирующую нейропатию). Согласно вариантам осуществления субъект не испытывает острых приступов, но испытывает болевые ощущения (например, хроническую боль, например, хроническую нейропатическую боль) и/или нейропатию). Согласно вариантам осуществления болевое ощущение представляет собой боль в животе.

Согласно вариантам осуществления субъект (а) имеет повышенный уровень ALA и/или PBG, и (b) испытывает болевые ощущения (например, хроническую боль, например хроническую нейропатическую боль) и/или нейропатию (например, прогрессирующую нейропатию). Согласно вариантам осуществления болевое ощущение представляет собой боль в животе.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет повышенный уровень ALA и/или PBG в плазме и/или в моче. Согласно вариантам осуществления повышенный уровень ALA и/или PBG сопровождается другими симптомами, например, болевыми ощущениями (например, хронической болью, например, хронической нейропатической болью) или нейропатией (например, прогрессирующей нейропатией). Согласно вариантам осуществления болевое ощущение представляет собой боль в животе. Согласно вариантам осуществления у субъекта не наблюдаются симптомы. Согласно вариантам осуществления субъект имеет генетическую мутацию, ассоциированную с порфирией, например мутацию, описанную в данном локументе.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет повышенный уровень (например, уровень в плазме или уровень в моче) предшественника порфирина, например ALA и/или PBG, например, уровень выше нормального значения, или выше или равен нормальному значению. Согласно вариантам осуществления упомянутый уровень выше нормального значения. Согласно вариантам осуществления нормального

ное значение соответствует двум стандартным отклонениям выше среднего уровня в образце здоровых индивидов. Согласно вариантам осуществления нормальное значение соответствует верхнему пределу нормального диапазона значений.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет уровень ALA и/или PBG в плазме или уровень ALA и/или PBG в моче, который выше, или выше или равен 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному или 5-кратному уровню верхнего предела нормального диапазона значений. Используемый в данном документе "верхний предел нормального диапазона значений" относится к уровню, который представляет собой верхний предел 95% доверительного интервала для эталонного образца, например, образца индивидов с нормальными показателями (например, дикого типа) или здоровых индивидов, например, индивидов, которые не естрадают порфирией. Согласно вариантам осуществления у субъекта уровень ALA и/или PBG в моче составляет выше 2-4-кратного уровня относительно верхнего предела нормального диапазона значений. Согласно вариантам осуществления у субъекта уровень ALA и/или PBG в моче составляет выше 4-кратного уровня относительно верхнего предела нормального диапазона значений.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для PBG в плазме составляет 0,12 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и имеет уровень PBG в плазме, который выше, или выше или равен 0,12, 0,24, 0,36, 0,48 или 0,60 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень PBG в плазме, который выше, или выше или равен 0,48 мкмоль/л.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для PBG в моче составляет 1,2 ммоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень PBG в моче, который выше, или выше или равен 1,2 ммоль/моль креатинина, 2,4 ммоль/моль креатинина, 3,6 ммоль/моль креатинина, 4,8 ммоль/моль креатинина или 6,0 ммоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень PBG в моче, который выше, или выше или равен 4,8 ммоль/моль креатинина.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для ALA в плазме составляет 0,12 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень ALA в плазме, который выше, или выше или равен 0,12, 0,24, 0,36, 0,48 или 0,60 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень ALA в плазме, который выше, или выше или равен 0,48 мкмоль/л.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для ALA в моче составляет 3,1 ммоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень ALA в моче, который выше, или выше или равен 3,1, 6,2, 9,3, 12,4 или 15,5 ммоль/моль креатинина.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа уменьшают один или несколько признаков или симптомов порфирии. Согласно вариантам осуществления с помощью способа снижают повышенный уровень ALA и/или PBG. Согласно вариантам осуществления с помощью способа уменьшают болевые ощущения (например, хроническую боль, например, хроническую нейропатическую боль) и/или нейропатию (например, прогрессирующую нейропатию). Согласно вариантам осуществления болевое ощущение представляет собой боль в животе. Согласно вариантам осуществления болевое ощущение представляет собой нейропатическую боль (например, боль, ассоциированную с прогрессирующей нейропатией при острых порфириях). Уменьшение болевых ощущений может включать, например, предупреждение болевых ощущений, задержку начала проявления болевых ощущений, снижение частоты болевых ощущений и/или снижение тяжести болевых ощущений. Согласно вариантам осуществления уменьшение болевых ощущений оценивают на основе применения субъектом антиболевой терапии.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа облегчают или предупреждают острые приступы порфирии, например, путем снижения тяжести, продолжительности или частоты приступов.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа уменьшают или предупреждают повреждение нервов.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа предупреждают ухудшение клинических показателей (например, предупреждают развитие патологических изменений) или результатом является улучшение клинических показателей, например, клинических показателей функции мышц и/или нервов, например, EMG и/или показателей скорости проводимости нерва.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа уменьшают применение субъектом гема.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа уменьшают применение субъектом антиболевой терапии.

Согласно вариантам осуществления с помощью способа снижают риск госпитализации.

Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для снижения уровня ALA и/или PBG (например, уровня ALA и/или PBG в плазме или в моче). Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для получения заранее определенного снижения повышенного уровня ALA и/или PBG.

Согласно вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение

до значения, меньшего или равного нормальному значению. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение соответствует верхнему пределу нормального диапазона значений. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение соответствует значению, равному двум стандартным отклонениям выше среднего уровня в эталонном образце.

Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для снижения уровня ALA и/или PBG у субъекта до уровня, который в два раза ниже верхнего предела нормального диапазона значений. Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для снижения уровня ALA в два раза ниже верхнего предела нормального диапазона значений. Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для снижения уровня PBG в два раза ниже верхнего референтного предела.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят в виде разовой дозы или нескольких доз, например, согласно схеме дозирования.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят субъекту, подверженному риску развития порфирии, профилактически. Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) или композицию, содержащую iRNA, вводят профилактически, начиная с периода полового созревания. Согласно вариантам осуществления субъект имеет генетическую мутацию, ассоциированную с порфирией, и/или имеет повышенный уровень ALA и/или PBG (например, повышенный уровень ALA и/или PBG в плазме или моче). Согласно вариантам осуществления мутация способствует восприимчивости субъекта к острому приступу (например, при воздействии провоцирующего фактора, например, лекарственного средства, пребывания на диете или другого провоцирующего фактора, например, провоцирующего фактора, раскрытого в данном документе). Согласно вариантам осуществления мутация ассоциирована с повышенными уровнями порфирина или предшественника порфирина (например, ALA и/или PBG). Согласно вариантам осуществления мутация ассоциирована с хронической болью (например, хронической нейропатической болью) и/или нейропатией (например, прогрессирующей нейропатией).

Согласно вариантам осуществления мутация представляет собой мутацию в гене ALAS1. Согласно вариантам осуществления мутация представляет собой мутацию в промоторе гена ALAS1, или в участках, расположенных выше или ниже относительно гена ALAS1. Согласно вариантам осуществления мутация представляет собой мутацию в факторах транскрипции или других генах, которые взаимодействуют с ALAS1. Согласно вариантам осуществления мутация представляет собой мутацию в гене, который кодирует фермент в рамках пути биосинтеза гема.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA или ее конъюгат) или композицию, содержащую iRNA, вводят подкожно. Согласно вариантам осуществления iRNA находится в форме конъюгата GalNAc. Согласно вариантам осуществления iRNA (например, dsRNA) вводят в дозе 0,5-50 мг/кг. Согласно определенным вариантам осуществления iRNA вводят в дозе менее 10 мг/кг (например, 5 мг/кг или менее) один раз в неделю; например, в дозе 1 мг/кг или менее, 2,5 мг/кг или менее, или 5 мг/кг или менее, например, один раз в неделю. Согласно одному варианту осуществления iRNA вводят в дозе приблизительно 2,5 мг/кг или менее, например, один раз в неделю.

Согласно вариантам осуществления у субъекта, который подлежит лечению, не наблюдаются симптомы, и он имеет повышенный уровень ALA и/или PBG. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией, например, AIP. Согласно вариантам осуществления пациент испытывает рецидивирующие приступы порфирии.

Согласно вариантам осуществления iRNA (например, AD-60519) вводят в дозе менее 5 мг/кг, например, по 0,1, 0,35, 1,0 или 2,5 мг/кг. Согласно вариантам осуществления iRNA (например, AD-60519) вводят в повторяющихся дозах, например, еженедельных дозах.

Согласно одному варианту осуществления у субъекта не наблюдаются симптомы, и он имеет повышенный уровень ALA и/или PBG, и iRNA (например, AD-60519) вводят в разовых дозах, например, по 0.1, 0.35, 1.0 или 2.5 мг/кг; или в повторяющихся еженедельных дозах, например, по 1 и 2.5 мг/кг в течение нескольких недель (например, в течение 4 недель).

Согласно одному варианту осуществления субъект имеет AIP, например, является пациентом с AIP, при этом iRNA (например, AD-60519) вводят в дозе 1-2,5 мг/кг еженедельно.

Согласно вариантам осуществления используют схему лечения, при которой iRNA изначально вводят более часто, с последующим менее частым введением. Согласно вариантам осуществления iRNA изначально вводят один раз в день в течение нескольких дней (например, в течение 2-14 дней, например, в течение 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней). Согласно вариантам осуществления iRNA затем вводят один раз в неделю. Согласно вариантам осуществления iRNA затем вводят один раз каждые две недели. Согласно вариантам осуществления iRNA затем вводят с частотой, эффективной для уменьшения одного или нескольких признаков или симптомов порфирии.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ лечения субъекта с повышенным уровнем ALA и/или PBG, при этом способ включает введение субъекту двунитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить из 15-30 пар оснований в длину и антисмысловая нить комплементарна по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам под SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:382.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ лечения субъекта с повышенным уровнем ALA и/или PBG, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества dsRNA или композиции, содержащей dsRNA, описанной в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы, описанные в данном документе, эффективны для снижения уровня ALA и/или PBG. Согласно некоторым вариантам осуществления уровень ALA и/или PBG снижают так, чтобы он был меньше, или меньше или равен нормальному значению, например, верхнему пределу нормального диапазона значений.

Согласно вариантам осуществления у субъекта, который подлежит лечению, не наблюдаются симптомы, и он имеет повышенный уровень ALA и/или PBG. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией, например AIP.

Согласно вариантам осуществления iRNA вводят в дозе менее 5 мг/кг, например по 0,1, 0,35, 1,0 или 2,5 мг/кг. Согласно вариантам осуществления iRNA вводят в повторяющихся дозах, например, еженедельных дозах.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении представлены способы снижения уровня порфирина или предшественника порфирина в клетке (например, эритроидной клетке или клетке печени, такой как, например, гепатоцит). Согласно одному варианту осуществления клетку обрабатывают ех vivo, in vitro или in vivo (например, клетка принадлежит субъекту (например, пациенту, нуждающемуся в лечении, предупреждении и/или контроле нарушения, связанного с экспрессией ALAS1)). Способ включает приведение клетки в контакт с эффективным количеством одной или нескольких из iRNA, нацеленных на ALAS1, например одной или нескольких из iRNA, раскрытых в данном документе, вследствие чего происходит снижение уровня порфирина или предшественника порфирина в клетке; или снижения уровня порфирина или предшественника порфирина в других клетках, тканях или жидкостях субъекта, в организме которого находится клетка, относительно уровня, предшествующего приведению в контакт. Такие способы можно применять для лечения (например, облегчения тяжести) нарушений, связанных с экспрессией ALAS1, таких как порфирии, например, AIP или порфирия, обусловленная недостаточностью дегидратазы ALA.

Согласно одному варианту осуществления стадия приведения в контакт является эффективной ех vivo, in vitro или in vivo. Например, клетка может принадлежать субъекту, например, млекопитающему (например, человеку), с риском возникновения порфирии или субъекту с диагностированной порфирией. Согласно варианту осуществления порфирия представляет собой острую печеночную порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию, например, порфирию, выбранную из острой перемежающейся порфирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP), порфирии, обусловленной недостаточностью дегидратазы ALA (ADP), и гематоэритропоэтической порфирии. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой печеночную порфирию у гомозигот по доминантному аллелю (например, ALP, HCP или VP у гомозигот по доминантному аллелю) или гепатоэритропоэтическую порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой двойную порфирию.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен способ снижения уровня порфирина или предшественника порфирина (например, ALA или PBG) в клетке, включающий приведение клетки в контакт с iRNA (например, dsRNA), описанной в данном документе, в количестве, эффективном для снижения уровня порфирина или предшественника порфирина в клетке.

Согласно вариантам осуществления клетка представляет собой гепатоцит. Согласно вариантам осуществления порфирин или предшественник порфирина представляет собой 8-аминолевулиновую кислоту (ALA), порфобилиноген (PBG), гидроксиметилбилан (HMB), уропорфириноген I или III, копропорфириноген I или III, протопорфириноген IX или протопорфирин IX. Согласно вариантам осуществления предшественником порфирина является ALA или PBG.

Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой эритроидную клетку. Согласно дополнительному варианту осуществления клетка представляет собой клетку печени (например, гепатоцит).

Согласно одному аспекту в данном документе представлен вектор, кодирующий по меньшей мере одну нить iRNA (например, dsRNA), описанную в данном документе.

Согласно одному аспекту в данном документе представлен вектор, кодирующий по меньшей мере одну нить dsRNA, где упомянутая dsRNA содержит участок комплементарности по меньшей мере к части mRNA, кодирующей ALAS1, где упомянутая dsRNA составляет 30 пар оснований или менее в длину, и где упомянутая dsRNA нацелена на упомянутую mRNA для расщепления.

Согласно вариантам осуществления участок комплементарности составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов в длину.

Согласно вариантам осуществления участок комплементарности составляет 19-21 нуклеотид в длину.Согласно одному аспекту в настоящем изобретении представлен вектор для ингибирования экспрессии гена ALAS1 в клетке. Согласно одному варианту осуществления вектор содержит iRNA, описанную в данном документе. Согласно одному варианту осуществления вектор включает по меньшей мере одну регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует по меньшей мере одну нить iRNA, описанную в данном документе. Согласно одному варианту осуществления вектор содержит по меньшей мере одну нить iRNA ALAS1.

Согласно одному аспекту в данном документе представлена клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе. Согласно одному аспекту представлена клетка, содержащая вектор для ингибирования экспрессии гена ALAS1 в клетке. Вектор включает регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует по меньшей мере одну нить из iRNA, описанных в данном документе. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой клетку печени (например, гепатоцит). Согласно другому варианту осуществления клетка представляет собой эритроидную клетку.

Согласно другому аспекту представлен способ анализа уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта, при этом упомянутый способ включает выявление (например, измерение) уровня mRNA ALAS1 в образце биологической жидкости (например, образце крови (например, образце сыворотки или плазмы), образце спинномозговой жидкости или мочи субъекта, при этом упомянутый образец биологической жидкости содержит mRNA ALAS1, таким образом анализируют уровень циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта.

Согласно другому аспекту представлен способ анализа уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта, при этом упомянутый способ включает (i) получение PHK (например, внеклеточной PHK) из образца биологической жидкости (например, образца крови или плазмы) от субъекта, при этом упомянутый образец биологической жидкости содержит mRNA ALAS1; (ii) получение cDNA ALAS1 из mRNA ALAS1; (iii) приведение в контакт cDNA ALAS1 с нуклеиновой кислотой (например, зондом и/или праймером), комплементарной cDNA ALAS1 или ее частью, с получением реакционной смеси; и (iv) выявление (например, измерение) уровня cDNA ALAS1 в реакционной смеси, где уровень cDNA ALAS1 указывает на уровень mRNA ALAS1, таким образом, анализируют уровень циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта.

Согласно вариантам осуществления упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец крови. Согласно вариантам осуществления упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец сыворотки. Согласно вариантам осуществления упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец мочи.

Согласно вариантам осуществления способ включает PCR, qPCR или 5'-RACE.

Согласно вариантам осуществления упомянутая нуклеиновая кислота представляет собой зонд или праймер.

Согласно вариантам осуществления упомянутая нуклеиновая кислота содержит выявляемый фрагмент, и при этом уровень mRNA ALAS1 определяют путем выявления количества выявляемого фрагмента.

Согласно вариантам осуществления упомянутый способ дополнительно включает получение образца биологической жидкости от субъекта. Согласно вариантам осуществления образец биологической жидкости является отделенным от ткани и содержит экзосомы. Согласно вариантам осуществления этих способов эффективность лечения порфирии оценивают на основании сравнения уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта относительно нормального значения.

Согласно вариантам осуществления снижение уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта, в ответ на лечение порфирии, относительно нормального значения, указывает на то, что лечение порфирии является эффективным. Согласно вариантам осуществления нормальное значение представляет собой уровень циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта до лечения порфирии.

Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, упомянутые в данном документе, включены при помощи ссылки во всей своей полноте.

Подробная информация о различных вариантах осуществления настоящего изобретения изложена ниже в описании. Другие характеристики, цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, а также из формулы изобретения.

### Описание графических материалов

На фиг. 1 обозначен путь биосинтеза гема.

На фиг. 2A и 2B показана таблица, в которой приведены определенные порфирии, ассоциированные с генетическими ошибками в рамках метаболизма гема.

На фиг. 3A и 3B обозначен транскрипт mRNA ALAS1 человека (эталонная последовательность NM\_000688.4 (GL40316942, дата регистрации 19 ноября 2011 г.), SEQ ID NO: 1).

На фиг. 4A и фиг. 4B обозначен транскрипт mRNA ALAS1 человека (эталонная последовательность NM\_000688.5 (GI: 362999011, дата регистрации 1 апреля 2012 г.), SEQ ID NO: 382).

На фиг. 5 показан дозозависимый эффект siRNA AD-53558 при подавлении mRNA ALAS1 мыши (mALAS1) относительно PBS в качестве контроля. Также показаны результаты для контроля AD-1955 с люциферазой (LUC).

На фиг. 6 показан дозозависимый эффект siRNA AD-53558 при подавлении mRNA ALAS1 у крыс относительно PBS в качестве контроля. Также показаны результаты для контроля AD-1955 с люциферазой (LUC). На фиг. 7 показана продолжительность подавления mRNA ALAS1 мыши (mALAS1) с помощью siRNA AD-53558 относительно PBS в качестве контроля.

На фиг. 8 показаны средние значения  $\pm$  стандартные отклонения уровней ALA в плазме (в мкМ) на исходном уровне и после обработки фенобарбиталом в экспериментальной (siRNA ALAS1) и контрольной (siRNA LUC) группах.

На фиг. 9 показаны уровни ALA в плазме (в мкМ) отдельных животных на исходном уровне и после обработки фенобарбиталом у животных, которые были подвержены обработке siRNA ALAS1 и контролем (siRNA LUC).

На фиг. 10 показаны средние значения  $\pm$  стандартные отклонения уровней PBG в плазме (в мкМ) на исходном уровне и после обработки фенобарбиталом у животных, которые были подвержены обработке siRNA ALAS1 и контролем (siRNA LUC).

На фиг. 11 показаны уровни PBG в плазме (в мкМ) отдельных животных на исходном уровне и после обработки фенобарбиталом у животных, которые были подвержены обработке siRNA ALAS1 и контролем (siRNA LUC).

На фиг. 12 показан относительный уровень mRNA mALAS1 в печени на исходном уровне и после обработки фенобарбиталом у отобранных типичных экспериментальных (siRNA ALAS1) и контрольных (PBS) животных.

На фиг. 13 показаны эффекты трех siRNA mALAS1, конъюгированных с GalNAc, в отношении экспрессии mALAS1 (относительно PBS в качестве контроля) в ткани печени мыши.

На фиг. 14 показаны уровни ALA и PBG в плазме в динамике после введения фенобарбитала и обработки siRNA ALAS1 или контрольной siRNA LUC.

На фиг. 15 показаны эффекты siRNA ALAS1, конъюгированных с GalNAc, в отношении уровней ALA и PBG в плазме в мышиной модели индукции AIP фенобарбиталом.

На фиг. 16 показаны дозозависимые эффекты siRNA ALAS1 в отношении уровней ALA и PBG в плазме в мышиной модели индукции AIP фенобарбиталом. Для животных, которые получали siRNA ALAS1, доза вводимой siRNA (0,05,0,1,0,5 или 1,0 мг/кг) показана на горизонтальной оси.

На фиг. 17 на верхней части рисунка показана схема эксперимента, применяемая для исследования подавления ALA и PBG с помощью siRNA ALAS1. На нижней части рисунка показаны уровни ALA и PBG в плазме на исходном уровне, в контрольном (Luc) состоянии и после обработки siRNA ALAS1 на 0, 2 и 4 неделе.

На фиг. 18 показана схема эксперимента, применяемая для сравнения эффектов лечения siRNA ALAS1 или гемином в отношении животной модели ALP (вверху), и результаты по уровням ALA (мкмоль/л) в плазме (в середине) и уровням PBG (мкмоль/л) в плазме (внизу).

На фиг. 19 показаны относительные уровни mRNA (ALAS1/GAPDH) у животных, обработанных 30, 10 или 3 мг/кг AD-58632, относительно животных, обработанных PBS в качестве контроля.

На фиг. 20 показана схема эксперимента, применяемая для изучения эффекта доза-ответ конъюгата GalNAc с AD-58632 ALAS1 в крысиной модели AIP.

На фиг. 21 показаны относительные уровни mRNA PBGD в печени (верхний график) и относительные уровни mRNA ALAS1 в печени (нижний график) в крысиной модели AIP. Группы животных подлежали одной из четырех обработок: (1) обработка только фенобарбиталом (PB), (2) обработка фенобарбиталом и siRNA порфобилиногендезаминазы (PBGD), (3) фенобарбиталом, siRNA PBGD и 30 мг/кг siRNA ALAS1, (4) фенобарбиталом, siRNA PBGD и 10 мг/кг siRNA ALAS1.

На фиг. 22 показаны уровни PBG (верхняя часть рисунка) и ALA (нижняя часть рисунка) в моче относительно уровней креатинина в крысиной модели ALP. Группы животных подлежали одной из четырех обработок: (1) обработка только фенобарбиталом (PB), (2) обработка фенобарбиталом и siRNA порфобилиногендезаминазы (PBGD), (3) фенобарбиталом, siRNA PBGD и 30 мг/кг siRNA ALAS1, (4) фенобарбиталом, siRNA PBGD и 10 мг/кг siRNA ALAS1.

На фиг. 23 показаны результаты подавления mRNA ALAS-1 с помощью AD-58632, относительно PBS в качестве контроля, в группах крыс, которые получали пять суточных доз siRNA по 6, 2 или 1 мг/кг по отношению к однократным болюсным дозам siRNA по 30, 10 или 5 мг/кг.

На фиг. 24 показаны результаты подавления mRNA ALAS-1 с помощью AD-58632, относительно PBS в качестве контроля, в группах крыс, которые получали четыре еженедельные дозы siRNA по 10, 5 или 2.5 мг/кг.

На фиг. 25 показаны результаты подавления mRNA ALAS-1 с помощью AD-58632 и с помощью пяти дуплексов из 19/19 мономеров .

На фиг. 26 показаны результаты оценки исследования эффекта длины нити и выступающих концов в отношении наиболее оптимальных двух дуплексов из 19 мономеров.

На фиг. 27 представлен график, на котором показаны уровни mRNA ALAS1 в печени (левые столбцы) и в сыворотке (правые столбцы) для каждой группы, подлежащей обработке при исследовании NHP, описанном в примере 34.

На фиг. 28 показаны результаты подавления mRNA ALAS-1 относительно PBS в качестве контроля,

в группах крыс, которые получали 3 или 10 мг/кг AD-58632 или AD-60489.

На фиг. 29 показана схема эксперимента, применяемая для изучения эффективности siRNA ALAS1 AD-58632 и AD-60489 в отношении подавления mRNA в печени у низших приматов.

На фиг. 30 показаны результаты дозозависимого подавления mRNA в печени у низших приматов после обработки 1,25, 2,5 или 5 мг/кг AD-58632 или AD-60489.

На фиг. 31 показано сравнение результатов подавления mRNA, полученных исходя из биоптатов печени и исходя из анализа сERD при исследовании на низших приматах.

На фиг. 32 показана динамика подавления mRNA, оцененного с применением анализа cERD при исследовании на низших приматах. На горизонтальной оси указано время согласно дню исследования.

На фиг. 33 показаны результаты подавления mRNA ALAS1 у крыс, которые получали PBS или разовую дозу, составляющую 5 мг/кг одного из указанных дуплексов siRNA.

На фиг. 34 приведены концентрации siRNA в печени крыс, которые получали разовую дозу, составляющую  $5 \, \mathrm{mr/kr}$  указанной siRNA.

На фиг. 35 (вверху) показан схема эксперимента, применяемая для изучения терапевтической эффективности AD-60925 и AD-60926. На фиг. 35 (внизу) показаны относительные уровни mRNA ALAS1/GAPDH крысы у крыс, обработанных (1) AF11-PBGD, (2) AF11-PBGD и PB, (3) AF-11PBGD, PB и 3 мг/кг AD-60925, или (4) AF11-PBGD, PB и AD-60926.

На фиг. 36 показаны относительные уровни PBG в моче (вверху) и ALA в моче (внизу) у крыс, обработанных (1) AF11-PBGD, (2) AF11-PBGD и PB, (3) AF-11PBGD, PB и 3 мг/кг AD-60925, или (4) AF11-PBGD, PB и AD-60926.

На фиг. 37 показаны относительные уровни PBG в моче (вверху) и ALA в моче (внизу) в динамике у крыс, обработанных (1) AF11-PBGD, (2) AF11-PBGD и PB, (3) AF-11PBGD, PB и 3 мг/кг AD-60925, или (4) AF11-PBGD, PB и AD-60926. Стрелки указывают на временные точки при введении PB.

На фиг. 38 показаны относительные уровни mRNA ALAS1 (rALAS1) крысы у крыс, которые получали 4 дозы PBS или 2,5 мг/кг одной из указанных siRNA.

На фиг. 39 показаны относительные уровни mRNA ALAS1 (rALAS1) крысы у крыс, которые получали разовую дозу PBS или 2,5 мг/кг одной из указанных siRNA.

На фиг. 40 (вверху) показаны относительные уровни mRNA ALAS1 (rALAS1) крысы у крыс, которые получали разовую дозу PBS или 3 мг/кг одной из указанных siRNA. На фиг. 40 (внизу) показана концентрация siRNA в печени.

На фиг. 41 (вверху) показаны результаты подавления mRNA ALAS1 (rALAS1) крысы с помощью AD-60489, AD-60519 и AD-60901. На фиг. 41 (внизу) приведена концентрация siRNA в печени.

На фиг. 42 показаны относительные уровни mRNA ALAS1 (rALAS1) крысы у крыс, которых обрабатывали разовой дозой PBS или 2,5 мг/кг одной из указанных siRNA.

На фиг. 43 показаны относительные уровни mRNA ALAS1 (rALAS1) крысы у крыс, которых обрабатывали PBS или одной из указанных siRNA в дозе 2,5 мг/кг два раза в неделю в течение 2 недель.

На фиг. 44 (вверху) показана схема эксперимента, применяемая для изучения терапевтической эффективности нескольких доз AD-60519 два раза в неделю. На фиг. 44 (внизу) показаны графики, обозначающие подавление PBG и ALA в моче у крыс, которых обрабатывали (i) siRNA PBGD и шестью дозами PBS, (ii) siRNA PBGD, PB и шестью дозами PBS, (iii) siRNA PBGD, PB и шестью дозами 2,5 мг/кг AD-60519, или (iv) siRNA PBGD, PB и шестью дозами 5 мг/кг AD-60519.

На фиг. 45 показаны графики, обозначающие подавление PBG (верхний график) и ALA (нижний график) в сыворотке в мышиной модели AIP, которых обрабатывали (i) siRNA PBGD и шестью дозами PBS (исходный уровень), (ii) siRNA PBGD, PB и шестью дозами PBS (солевой раствор), (iii) siRNA PBGD, PB и шестью дозами 2,5 мг/кг AD-60519, или (iv) siRNA PBGD, PB и шестью дозами 5 мг/кг AD-60519.

На фиг. 46 (вверху) показана схема эксперимента, применяемая для изучения терапевтической эффективности нескольких еженедельных доз AD-60519. На фиг. 46 (внизу) показан график, обозначающий относительные уровни mRNA ALAS1 (rALAS1/GAPDH) крысы у крыс, которых обрабатывали (i) siRNA PBGD и четырьмя дозами PBS, (ii) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами PBS, (iii) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами 3 мг/кг AD-60519, (iv) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами 1 мг/кг AD-60519, или (v) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами 0,3 мг/кг AD-60519.

На фиг. 47 показаны графики, обозначающие уровни PBG (верхний график) и ALA (нижний график) в моче у крыс, которых обрабатывали (i) siRNA PBGD и четырьмя дозами PBS, (ii) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами PBS, (iii) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами 3 мг/кг AD-60519, (iv) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами 1 мг/кг AD-60519 или (v) siRNA PBGD, PB и четырьмя дозами 0,3 мг/кг AD-60519.

На фиг. 48 представлена диаграмма, на которой показана схема исследования на низших приматах, в котором изучали эффекты конъюгатов GalNAc с siRNA ALAS1 в отношении подавления mRNA ALAS1 в печени и mRNA ALAS1 в крови.

На фиг. 49 представлен график, на котором показаны результаты подавления mRNA в печени у низших приматов (NHP) после обработки конъюгатами GalNAc с siRNA ALAS1.

На фиг. 50 представлен график, на котором показаны нормализованные уровни mRNA ALAS1 в сыворотке у низших приматов (NHP) в различные периоды времени в ходе проведения исследования, в котором изучали эффекты обработки конъюгатами GalNAc с siRNA ALAS1. Дни на горизонтальной оси соответствуют дням на диаграмме из фиг. 48.

На фиг. 51 показаны нормализованные уровни mRNA ALAS1 (показано в виде доли уровня дозы до приема лекарственного средства), при оценке в исследовании для разовой дозы у крыс, в котором применяли cERD в моче для отслеживания подавления ALAS1.

На фиг. 52 представлена схема, на которой показана схема исследования на низших приматах, в котором изучали эффекты нескольких доз и разовой дозы AD-60519 в отношении подавления mRNA ALAS1 в печени и mRNA ALAS1 в крови.

На фиг. 53 представлена столбиковая диаграмма, на которой показаны средние относительные уровни mRNA ALAS1 в печени (% PBS в качестве контроля) на 24 день исследования (группы с несколькими дозами) или на 4 день исследования (группы с разовой дозой).

На фиг. 54 представлен график, на котором показаны нормализованные уровни mRNA ALAS1 в сыворотке (показано в виде доли уровня дозы до приема лекарственного средства) при оценке с применением сЕRD для групп с несколькими дозами (верхний график, показывающий результаты вплоть до 24 дня) и групп с разовой дозой (нижний график, показывающий результаты вплоть до 22 дня).

На фиг. 55 представлен график, на котором показаны уровни mRNA в печени, mRNA в сыворотке и mRNA в моче на 4 день исследования (в группах с разовой дозой) или на 24 день исследования (в группах с несколькими дозами). Показаны данные для отдельных животных и средние величины для каждой группы.

На фиг. 56 представлен график, на котором показаны нормализованные уровни mRNA ALAS1 в сыворотке (показано в виде доли уровня дозы до приема лекарственного средства) через 8 недель при оценке с применением cERD для групп с несколькими дозами. Каждая точка на графике представляет остаточную mRNA ALAS1 для средней величины группы образцов 3 животных  $\pm$  стандартное отклонение группы.

На фиг. 57 представлена схема структуры ALN-60519 (также называемая в данном документе AD-60519). На фиг. 57 раскрыты SEQ ID NO 5238-5239 соответственно, по порядку.

На фиг. 58 показаны уровни mRNA ALAS1 при оценке соответствующих образцов сыворотки и мочи или от пациентов с ALP, или от здоровых добровольцев (NHV). Уровни mRNA ALAS1 в сыворотке или моче измеряли с применением способа сERD. Для пациентов A и B с ALP проводили забор второго набора образцов сыворотки и мочи для оценки изменений mRNA ALAS1 в динамике.

## Подробное описание изобретения

iRNA управляет специфическим в отношении последовательности разрушением mRNA посредством процесса, известного как PHK-интерференция (RNAi). В данном документе описаны iRNA и способы их применения для ингибирования экспрессии гена ALAS1 в клетке или у млекопитающего, где iRNA нацелена на ген ALAS1. Также представлены композиции и способы лечения нарушений, связанных с экспрессией ALAS1, таких как порфирии (например, порфирия, обусловленная недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP или порфирия Досса), острая перемежающаяся порфирия, врожденная эритропоэтическая порфирия, поздняя кожная порфирия, наследственная копропорфирия (копропорфирия), вариегатная порфирия, эритропоэтическая протопорфирия (EPP), X-сцепленная сидеробластическая анемия (XLSA) и транзиторная эритропорфирия детского возраста).

Порфирии представляют собой врожденные или приобретенные нарушения, причиной которых может быть пониженная или повышенная активность определенных ферментов в пути биосинтеза гема, также называемого в данном документе порфириновым путем (см. фиг. 1). Порфирины являются основными предшественниками гема. Порфирины или предшественники порфирина включают 5-аминолевулиновую кислоту (ALA), порфобилиноген (PBG), гидроксиметилбилан (HMB), уропорфириноген I или III, копропорфириноген I или III, протопорфириноген LX и протопорфирин IX. Гем является неотъемлемой частью гемоглобина, миоглобина, каталаз, пероксидаз и цитохромов, при этом последние включают цитохромы легких и цитохромы Р450 печени. Гем синтезируется в большинстве или во всех клетках организма человека. Приблизительно 85% гема образуется в эритроидных клетках, преимущественно для гемоглобина. Большая часть оставшегося гема образуется в печени, 80% которого используется для синтеза цитохромов. Недостаточность определенных ферментов в порфириновом пути приводит к недостаточному образованию гема, а также к накоплению предшественников порфиринов и/или порфиринов, которые в высоких концентрациях могут быть токсичны для работы клеток или органов.

Порфирии могут проявляться на ряду с неврологическими осложнениями ("острые"), проблемами с кожей ("кожные") или обоими. Порфирии можно классифицировать по основному сайту локализации сверхсинтеза и накопления порфиринов или их предшественников. При печеночных порфиринх порфирины и предшественники порфиринов сверхсинтезируются преимущественно в печени, в то время как при эритропоэтических порфириях порфирины сверхсинтезируются в эритроидных клетках в кости. Острые и печеночные порфирии приводят к нарушению работы нервной системы и неврологическим проявлениям, которые влияют как на центральную, так и на периферическую нервную систему, что при-

водит к появлению симптомов, таких как, например, болевые ощущения (например, боль в животе и/или хроническая нейропатическая боль), рвота, нейропатия (например, острая нейропатия, прогрессирующая нейропатия), мышечная слабость, судороги, расстройства психики (например, галлюцинации, депрессия, тревожность, паранойя), сердечные аритмии, тахикардия, запор и диарея. Кожные или эритропоэтические порфирии преимущественно поражают кожу, вызывая симптомы, такие как фотосенсибилизация, которая может быть болезненной, пузыри, некроз, зуд, отечность и усиленный рост волос в определенных областях, таких как лоб. Последующая инфекция повреждений кожи может приводить к потери костей и тканей, а также образованию шрамов, обезображиванию и потере пальцев (например, пальцев рук, пальцев ног). Большинство порфирии вызваны мутациями генов, которые кодируют ферменты в рамках пути биосинтеза гема. Краткое описание порфирии, связанных с генетическими ошибками в метаболизме гема, представлено на фиг. 2.

Не все порфирии являются генетически обусловленными. Например, у пациентов с заболеванием печени может развиться порфирия в результате нарушения работы печени, а транзиторная форма эритропорфирии (транзиторная эритропорфирия детского возраста) была описана для детского возраста (см. Crawford, R.I. et al, JAmAcad Dermatol. 1995 авг; 33(2 Pt 2): 333-6.). У пациентов с РСТ может быть приобретенная недостаточная активность уропорфиногендекарбоксилазы (URO-D) вследствие образования фермента ORO-D с более низкой, чем нормальная, активностью фермента (см. Phillips et al. Blood, 98: 3179-3185, 2001.)

Острая перемежающаяся порфирия (AIP) (также называемая недостаточностью порфобилиногендезаминазы (PBG), или недостаточностью гидроксиметилбилансинтазы (HMBS)), является наиболее распространенным типом острой печеночной порфирии. Другие типы острых печеночных порфирий включат наследственную копропорфирию (HCP), вариегатную порфирию (VP) и порфирию, обусловленную недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP). Острые печеночные порфирий описаны, например, в Balwani, M and Desnick, R.J., Blood, 120:4496-4504, 2012.

АІР является, как правило, аутосомно-доминантным заболеванием, которое характеризуется недостаточностью фермента порфобилиногендезаминазы (PBG-дезаминаза); этот фермент также известен как гидроксиметилбилансинтаза (HMB синтаза или HMBS). PBG-дезаминаза является третьим ферментом в пути биосинтеза гема (см. фиг. 1) и катализирует реакцию конденсации по типу "голова к хвосту" четырех молекул порфобилиногена в линейный тетрапиррол, гидроксиметилбилан (HMB). Были описаны образованные в результате альтернативного сплайсинга варианты транскриптов, кодирующие различные изоформы PBG-дезаминазы. Мутации в гене PBG-дезаминазы ассоциированы с AIP. Такие мутации могут приводить к пониженному количеству PBG-дезаминазы и/или пониженной активности PBG-дезаминазы (индивиды, пораженные заболеванием, как правило, имеют ~50% снижение активности PBG-дезаминазы).

Существует по меньшей мере две различные модели патофизиологии AIP и других острых печеночных порфирий (см., например, Lin CS-Y et al., Clinical Neurophysiology, 2011; 122:2336-44). Согласно одной модели, сниженный уровень образования гема вследствие недостаточности PBG-дезаминазы вызывает энергетический дефицит и дегенерацию аксонов. Согласно другой, на сегодняшний день более предпочтительной модели, накопление предшественников порфиринов (например, ALA и PBG) приводит к нейротоксичности.

Было обнаружено, что AIP распространена в определенных популяциях с частотой до 1 на 10000 (например, в Северной Швеции; см. Floderus Y., et al. Clin Genet. 2002;62:288-97). По оценкам, распространенность в общей популяции в Соединенных Штатах и Европе, за исключением Великобритании, составляет приблизительно от 1 на 10000 до 1 на 20000. Собственно клиническое заболевание проявляется лишь у приблизительно 10-15% индивидов, которые несут мутации, которые, как известно, ассоциированы с AIP. Однако, у индивидов с определенными мутациями пенетрантность составляет до 40% (например, мутация W198X). AIP, как правило, находится в латентной форме до периода полового созревания. Симптомы более распространены у женщин, чем у мужчин. Распространенность заболевания вероятно занижена вследствие его неполной пенетрантности и длительных латентных периодов. В Соединенных Штатах по оценкам насчитывается приблизительно 2000 пациентов, которые испытали по меньшей мене один приступ. По оценкам насчитывается приблизительно 150 активных рецидивирующих случаев во Франции, Швеции, Великобритании и Польше; этими пациентами являются преимущественно молодые женщины со средним возрастом 30 лет. См., например, Elder et al, J Inherit Metab Dis., опубликованную в Интернете 1 ноября 2012 г.

АІР поражает, например, висцеральную, периферическую, вегетативную и центральную нервную системы. Симптомы АLР разнообразны и включают симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта (например, сильную и нечетко локализированную боль в животе, тошноту/рвоту, запор, диарею, непроходимость кишечника), симптомы со стороны мочевыводящих путей (дизурия, задержка мочеиспускания/недержание мочи или темная моча, например, темно-красная моча), неврологические симптомы (например, сенсорная нейропатия, моторная нейропатия (например, поражение черепных нервов и/или приведение к слабости в руках и ногах), судороги, нейропатическая боль (например, боль, ассоциированная с прогессирующей нейропатией, например, хроническая нейропатическая боль), психоневрологические

симптомы (например, спутанность сознания, тревожность, возбуждение, галлюцинации, истерия, делирий, апатия, депрессия, фобии, психоз, бессонница, сонливость, кома), поражение вегетативной нервной системы (приводящее, например, к симптомам со стороны сердечно-сосудистой системы, таким как тахикардия, гипертензия и/или аритмии, а также другим симптомам, таким как, например, повышенные уровни катехоламинов в крови, потение, возбужденное состояние и/или тремор), обезвоживание и нарушения баланса электролитов. Наиболее распространенными симптомами являются боль в животе и тахикардия. Неврологические проявления включают моторную и вегетативную нейропатию и судороги. У пациентов часто наблюдается хроническая нейропатическая боль и развивается прогрессирующая нейропатия. Пациенты с рецидивирующими приступами часто имеют продром. После тяжелого приступа может возникать необратимый паралич. Нормализация после тяжелых приступов, которые своевременно не лечили, может занять недели или месяцы. Острый приступ может быть летальным, например, вследствие паралича дыхательных мышц или сердечно-сосудистой недостаточности вследствие нарушения баланса электролитов. (См., например, Thunell S. Hydroxymethylbilane Synthase Deficiency. 2005 сентября 27 [обновлено 1 сентября 2011 г.]. В: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [интернет]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 (далее в данном документе Thunell (1993)), который включен, таким образом, при помощи ссылки во всей своей полноте.) До того, как лечение гемином стало доступным, до 20% пациентов с ALP умирали от заболевания.

Индивиды, которые несут гены ALP, подвержены повышенному риску возникновения гепатоцеллюлярного рака. У индивидов с рецидивирующими приступами риск гепатоцеллюлярного рака является особенно серьезным: после 50 лет риск почти в 100 раз выше, чем в общей популяции.

Приступы острой порфирии могут провоцироваться эндогенными или экзогенными факторами. Механизмы, с помощью которых такие факторы индуцируют приступы, могут включать, например, повышенную потребность в ферментах P450 печени и/или индукцию активности ALAS1 в печени. Повышенная потребность в ферментах P450 печени приводит к сниженному содержанию свободного гема в печени, тем самым индуцируя синтез ALAS1 печени.

Провоцирующие факторы включают голодание (или другие формы пониженной или недостаточной калорийности потребляемой пищи вследствие жестких диет, занятий спортом, связанных с длинными дистанциями и т. д.), формы стресса, связанные с метаболизмом (например, инфекции, оперативное вмешательство, международные авиаперелеты и психологический стресс), эндогенные гормоны (например, прогестерон), курение сигарет, жирорастворимые чужеродные химические соединения (в том числе, например, химические соединения, присутствующие в табачном дыме, определенные лекарственные средства рецептурного отпуска, органические растворители, биоциды, соединения в алкогольных напитках), эндокринные факторы (например, половые гормоны (женщины могут испытывать обострения болезни во время менструального периода), синтетические эстрогены, прогестероны, стимуляторы овуляции и гормональная заместительная терапия). См., например, Thunell (1993).

Свыше 1000 лекарственных средств противопоказаны при острых печеночных порфириях (например, AIP, HCP, ADP и VP), в том числе, например, спирт, барбитураты, карбамазепин, каризопродол, клоназепам (высокие дозы), даназол, диклофенак и другие допустимые NSAIDS, препараты спорыньи, эстрогены, этхлорвинол, глютетимид, гризеофульвин, мефенитоин, мепробамат (также мебутамат и тибутамат), метиприлон, методопрамид, фенитоин, примидон, прогестерон и синтетические прогестины, пиразинамид, пиразолоны (аминопирин и антипирин), рифампин, сукцинимиды (этосукцимид и метсукцимид), сульфонамидные антибиотики и вальпроевая кислота.

Объективные признаки AIP включают изменение цвета мочи во время острого приступа (моча может выглядеть красной или красно-коричневой) и повышенные концентрации PBG и ALA в моче во время острого приступа. Молекулярно-генетическое тестирование позволяет идентифицировать мутации в гене PBG-дезаминазы (также известной как HMBS) у более 98% пораженных заболеванием индивидов. Thunell (1993).

Диагностика порфирии может включать оценку семейного анамнеза, оценку уровней предшественников порфиринов в моче, крови или кале, и/или оценку активности ферментов и анализ мутаций ДНК. Дифференциальная диагностика порфирии может включать определение типа порфирии на основе измерений отдельных уровней порфиринов или предшественников порфиринов (например, ALA, PBG) в моче, кале и/или плазме (например, при помощи хроматографии или флуорометрии) во время приступа. Диагноз AIP может быть подтвержден установлением того, что активность PBG-дезаминазы в эритроцитах составляет 50% или менее относительно нормального уровня. ДНК-тестирование в отношении мутаций можно проводить для пациентов и членов семей с повышенным риском. Диагноз AIP, как правило, подтверждается по ДНК-тестированию для идентификации конкретной вызывающей болезнь мутации гена (например, мутации HMBS).

Общепринятый контроль острых приступов AIP включает госпитализацию, отслеживание симптомов и устранение небезопасных лекарственных средств. Лечение острых приступов, как правило, требует госпитализации для контроля и лечения острых симптомов, в том числе, например, боли в животе, судорог, обезвоживания/гипонатриемии, тошноты/рвоты, тахикардии/гипертензии, задержки мочеиспускания/непроходимости кишечника. Например, боль в животе можно лечить, например, наркотическими

анальгетиками, судороги можно лечить профилактическими противосудорожными средствами и допустимыми лекарственными препаратами (хотя многие противосудорожные препараты противопоказаны), тошноту/рвоту можно лечить, например, фенотиазинами, и тахикардию/гипертензию можно лечить, например, бета-блокаторами. Лечение может включать отказ от небезопасных лекарственных препаратов, отслеживание дыхательной функции, а также мышечной силы и неврологического статуса. Умеренные приступы (например, приступы без пареза или гипонатриемии) можно лечить по меньшей мере 300 г внутривенной 10% глюкозы в день, хотя незамедлительно обеспечивают повышенное введение гемина. Тяжелые приступы, как правило, лечат как можно раньше гемином с внутривенным введением (3-4 мг/кг в сутки в течение 4-14 дней) и IV глюкозой при ожидании начала действия IV гемина. Как правило, приступы лечат IV гемином в течение 4 дней и IV глюкозой при ожидании введения IV гемина. В течение 3-4 дней после начала введения гемина часто наблюдается клиническое улучшение, сопровождающееся понижением уровней ALA и PBG.

Гемин (пангематин® или гемин для инъекции, ранее известный как гематин) является единственным препаратом, одобренным для применения в Соединенных Штатах, и был первым лекарственным средством, одобренным Законом об орфанных лекарственных препаратах. Пангематин® представляет собой гемин, полученный из обработанных эритроцитов (PRBC), и представляет собой протопорфирин IX, содержащий ион трехвалентного железа (гем В) с хлоридным лигандом. Гем служит для ограничения синтеза порфирина в печени и/или костного мозге. Точный механизм, с помощью которого гемин приводит к симптоматическому улучшению у пациентов с острыми случаями печеночных порфирий, пока не был выяснен; однако, его действие, по-видимому, связано с (механизм обратной связи) ингибированием синтазы 8-аминолевулиновой кислоты (ALA), фермента, который ограничивает скорость пути биосинтеза порфирина/гема. См. Рапhетаtin® product label, Lundbeck, Inc., октябрь 2010 г. Ингибирование ALA-синтазы должно приводить к пониженному образованию ALA и PBG, а также порфиринов и промежуточных соединений порфиринов.

Недостатки препаратов на основе тема (например, гемина) включают отсроченное влияние в отношении клинических симптомов и неспособность предотвратить рецидив приступов. Побочные реакции, ассоциированные с введением тема (например, гемина) могут включать флебит (например, тромбофлебит), затрудненность венозного доступа, антикоагуляцию (или коагулопатии), тромбоцитопению, отказ почек или перенасыщение железом, что особенно вероятно в случае пациентов, требующих нескольких курсов лечения гемином при рецидивирующих приступах. У пациентов с рецидивирующими приступами для предупреждения флебита необходим постоянный венозный катетер для возможности доступа. При высоких дозах может происходить повреждение почек. Редкие зарегистрированные побочные эффекты включают лихорадку, боль, чувство общего недомогания, гемолиз, анафилаксию и острую сосудистую недостаточность. См. Anderson К.Е., Approaches to Treatment and Prevention of Human Porphyrias, в The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyrins, Edited by Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Roger Guilard (2003) (далее в данном документе Anderson).

Гем сложно получать в стабильной форме для внутривенного введения. Он нерастворим при нейтральном рН, но его можно получать в виде гидроксида гема при рН 8 или выше. Anderson. Пангематин представляет собой лиофилизированный препарат гемина. При растворении лиофилизированного гемина для внутривенного введения быстро образуются продукты распада; эти продукты распада обуславливают временный антикоагулянтный эффект и флебит в участке инфузии. Anderson. Гемальбумин и аргинат гема (нормосанг, европейский вариант гемина) являются более стабильными и потенциально могут приводить к менее интенсивному тромбофлебиту. Однако, в Соединенных Штатах аргинат гема не одобрен для применения. Пангемин можно стабилизировать путем растворения его для инфузии в 30% альбумине человека вместо стерильной воды; однако, альбумин увеличивает внутрисосудистый объем и расширяющие эффекты и повышает стоимость лечения, а также риск, связанный с патогенами, поскольку его выделяют из крови человека. См., например, Anderson, выше.

Успешное лечение острого приступа не предупреждает или отсрочивает рецидив. Стоит вопрос о том, может ли сам гемин вызывать рецидивирующие приступы вследствие индукции гемоксигеназы. Несмотря на это, в некоторых областях (особенно Франции), молодых женщин с несколькими рецидивирующими приступами с целью осуществления профилактики подвергают лечению гемином еженедельно

Небольшой опыт трансплантации печени указывает на то, что при успешном исходе это можно считать эффективным лечением AIP. В Европе насчитывалось примерно 12 трансплантаций у пациентов, с лечебным или отличающимся эффектами. Трансплантация печени может восстанавливать нормальную экскрецию ALA и PBG и предупреждать острые приступы. См., например, Dar, F.S. et al. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 9(1): 93-96 (2010). Кроме того, если печень пациента с ALP пересаживают другому пациенту ("домино-трансплантат"), у пациента, получающего трансплантат, может развиться AIP. Среди отдаленных клинических эффектов острых порфирий имеет место хроническая нейропатическая боль, которая может быть следствием прогрессирующей нейропатии, обусловленной нейротоксическими эффектами, например, повышенным содержанием предшественников порфиринов (например, ALA и/или

РВС). Нейротоксические эффекты могут быть ассоциированы с образованием токсических промежуточных соединений гема, например, измененной передачей сигналов GABA и/или опосредованного железом окисления и образованием активных форм кислорода (ROS). Пациенты могут испытывать нейропатическую боль до или во время острого приступа. Пациенты старшего возраста могут испытывать усиленную нейропатическую боль с возрастом, для лечения которой, как правило, назначают различные наркотические лекарственные средства. У пациентов с острыми печеночными порфириями были зафиксированы нарушения электромиограммы и уменьшение времени проведения возбуждения. Следует отметить, что у мышей с ALP (недостаточность РВG-дезаминазы), которых не подвергали обработке и стимуляции, развивается прогрессирующая моторная нейропатия, которая, как было показано, вызывает прогрессирующую дегенерацию и гибель аксонов нерва, контролирующего четырехглавую мышцу, предположительно, вследствие постоянно повышенных уровней предшественников порфиринов (ALA и PBG), порфиринов и/или недостатка гема (Lindberg et al., J. Clin. Invest., 103(8): 1127-1134, 1999). Среди пациентов с острой порфирией (например, ADP, AIP, HCP или VP) между приступами уровни предшественников порфиринов (ALA и PBG) часто повышены у пациентов, у которых не наблюдаются симптомы и у пациентов, у которых наблюдаются симптомы. Таким образом, ожидается, что снижение количества предшественников порфиринов и возобновление нормального биосинтеза гема посредством снижения уровня экспрессии и/или активности ALAS1, будет предупреждать и/или минимизировать развитие хронической и прогрессирующей нейропатии. Лечение, например, длительное лечение (например, периодическое лечение с помощью iRNA, описанной в данном документе, например, лечение согласно схеме дозирования, описанной в данном документе, например, еженедельное лечение или лечение два раза в неделю) может непрерывно снижать экспрессию ALAS1 у пациентов с острой порфирией, которые имеют повышенные уровни предшественников порфиринов, порфиринов, продуктов порфиринов или их метаболитов. Такое лечение может быть предусмотрено при необходимости предупреждения или снижения частоты или тяжести отдельных симптомов у пациента (например, боли и/или нейропатии) и/или снижения уровня предшественника порфирина, порфирина, продукта порфирина или метаболита.

Существует необходимость идентификации новых терапевтических средств, которые можно применять для лечения порфирий. Как было описано ранее, существующие варианты лечения, такие как продукты на основе гема (например, гемин), имеют многочисленные недостатки. Например, влияние гемина на клинические симптомы является отсроченным, он является дорогостоящим и может оказывать побочные эффекты (например, тромбофлебит, антикоагуляцию, тромбоцитопению, перенасыщение железом, отказ почек). Новые терапевтические средства, такие как описанные в данном документе, могут быть направлены на эти недостатки и неудовлетворенные потребности пациентов, с более быстрым действием, без индуцирования флебита, с обеспечением возможности подкожного введения, успешным предупреждением рецидивирующих приступов, предупреждением или облегчением болевых ощущений (например, хронической нейропатической боли) и/или прогрессирующей нейропатии, и/или они не вызывают определенных побочных эффектов, ассоциированных с гемином (например, перенасыщение железом, повышенный риск гепатоцеллюлярного рака).

Пациенты с АІА включают пациентов, которые испытывают рецидивирующие приступы, и пациентов, которые испытывают острые, единичные приступы. Среди пациентов, которые испытывают рецидивирующие приступы, приблизительно 5-10% страдают от рецидивирующих перемежающихся приступов (2-3 приступа в год) или рецидивирующих приступов (>4 приступов в год). Для этих пациентов вероятнее всего рассматривается вопрос о трансплантации печени или получении профилактических инфузий гема (например, гемина). Пациенты с рецидивирующими приступами вероятнее всего имеют низкое качество жизни вследствие длительных пребываний в больнице, опиатной зависимости и/или токсичности для венозной сети. Длительное введение гема может индуцировать гемоксигеназу (НО-1). Таким образом, постепенное снижение дозы гема пациентам может составлять сложность, и некоторым требуется более частое введение. Некоторые врачи в связи с этим ограничивают применение гема до случаев с наиболее серьезными приступами. Соответственно, существует неудовлетворенная потребность в подходящей, эффективной профилактике и вариантах лечения с лучшей переносимостью.

Для пациентов, которые испытывают острые приступы, клинические рекомендации предполагают введение гема как можно раньше. Однако, учитывая трудности диагностики и отсутствие незамедлительной доступности лекарственных препаратов, введение может быть отсроченным. Медленное начало проявления эффектов гема (например, гемина) и его плохая переносимость замедляют наступление улучшения. В связи с наличием продолжительной сильной боли в животе, даже после введения гема, может потребоваться, чтобы пациенты получали опиаты в течение нескольких дней.

Отсроченное введение гема или продолжающееся воздействие провоцирующих факторов может приводить к более серьезным осложнениям, в том числе моторной нейропатии и сопутствующих симптомов (например, слабости, пареза). В тяжелых случаях может возникать дыхательная недостаточность и паралич. Восстановление от неврологических симптомов может потребовать намного дольше времени для выздоровления. Соответственно в контексте острых приступов необходимы варианты лечения, характеризующиеся ускоренным началом действия и лучшей переносимостью. Фармакологическая валидность ALAS1 в качестве цели для сайленсинга mRNA основана, по меньшей мере, на следующих резуль-

татах: mRNA ALAS1 в значительной степени активирована во время приступа; пангематин подавляет ALAS-1, а добавление гема к клеткам печени в культуре приводит к пониженному количеству mRNA ALAS-1. Некоторые результаты также указывают на то, что подавление mRNA ALAS1 может быть достигнуто путем нацеливания на печень. Например, было показано, что трансплантация печени характеризуется лечебным эффектом, а метаболиты из печени стимулируют приступы (см., например, Dar et al. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 9: 93-6 (2010); Dowman et al. Ann Intern Med 154: 571-2 (2011) и Wu et al. Genes Dev 23:2201-2209 (2009). Поэтому снижение уровня экспрессии ALAS1, например, в печени, с применением композиций на основе iRNA, можно применять для лечения порфирии. Согласно определенным вариантам осуществления композиции на основе iRNA можно применять для профилактики и неотложного лечения порфирии. Например, композиции на основе iRNA можно применять профилактически при наступлении рецидивирующих приступов для индуцирования длительного или хронического подавления экспрессии ALAS1 (что приводит к длительному или хроническому подавлению ALA/PBG), и, таким образом, ослаблению рецидивирующей активации ALAS1, которая стимулирует приступы. Такое профилактическое лечение может снижать число и тяжесть приступов. Во время наступления острого приступа введение композиции на основе iRNA может оказывать лечебный эффект в отношении острого приступа, например, посредством снижения уровней ALA/PBG.

В настоящем раскрытии представлены способы и композиции на основе iRNA для модулирования экспрессии гена ALAS1. Согласно определенным вариантам осуществления экспрессию ALAS1 снижают или ингибируют с применением iRNA, специфической по отношению к ALAS1, что, таким образом, приводит к пониженной экспрессии гена ALAS1. Сниженная экспрессия гена ALAS1 может снижать уровень одного или нескольких предшественников порфиринов, порфиринов или продуктов или метаболитов порфиринов. Пониженная экспрессия гена ALAS1, а также связанное с этим снижение уровня одного или нескольких предшественников порфиринов и/или порфиринов, может быть пригодным при лечении нарушений, связанных с экспрессией ALAS1, например, порфириями.

iRNA композиций, описанных в данном документе, включают нить РНК (антисмысловую нить) с участком, который составляет 30 нуклеотидов или менее в длину, например, 15-30 нуклеотидов в длину, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, этот участок практически комплементарен по меньшей мере части mRNA-транскрипта гена ALAS1 (также называемого в данном документе "iRNA, специфическая по отношению к ALAS1"). Применение такой iRNA обеспечивает целевое разрушение mRNA генов, которые вовлечены в патологии, ассоциированные с экспрессией ALAS1 у млекопитающих, например, порфирии, такие как порфирия, обусловленная недостаточностью АLA-дегидратазы (также известная как порфирия Досса или плюмбопорфирия) или острая перемежающаяся порфирия. Очень низкие дозы iRNA, специфических по отношению к ALAS1, могут специфично и эффективно опосредовать RNAi, что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена ALAS1. iRNA, нацеленные на ALAS1, могут специфично и эффективно опосредовать RNAi, что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена ALAS1, например, в анализах на клетках. Таким образом, способы и композиции, включающие эти iRNA, пригодны для лечения патологических процессов, связанных с экспрессией гена ALAS1, таких как порфирии (например, X-сцепленная сидеробластическая анемия (XLSA), порфирия, обусловленная недостаточностью ALA-дегидратазы (порфирия Досса), острая перемежающаяся порфирия (AIP), врожденная эритропоэтическая порфирия, поздняя кожная порфирия, наследственная копропорфирия (копропорфирия), вариегатная порфирия, эритропоэтическая протопорфирия (ЕРР) и транзиторная эритропорфирия детского возраста).

В следующем описание раскрывается, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для ингибирования экспрессии гена ALAS1, а также композиции и способы лечения заболеваний и нарушений, вызванных или модулируемых экспрессией этого гена. Варианты осуществления фармацевтических композиций, описанных в настоящем изобретении, включают iRNA с антисмысловой нитью, содержащей участок, который составляет 30 нуклеотидов или менее в длину, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, при этом этот участок практически комплементарен по меньшей мере части РНК-транскрипта гена ALAS1, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Варианты осуществления композиций, описанных в настоящем изобретении, также включают iRNA с антисмысловой нитью с участком комплементарности, который составляет 30 нуклеотидов или менее в длину, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, и практически комплементарен по меньшей мере части РНК-транскрипта гена ALAS1.

Соответственно, согласно некоторым аспектам в настоящем изобретении описаны фармацевтические композиции, содержащие iRNA ALAS1 и фармацевтически приемлемый носитель, способы применения композиций для ингибирования экспрессии гена ALAS1, и способы применения фармацевтических композиций для лечения нарушений, связанных с экспрессией ALAS1.

#### I Определения

В целях удобства значение определенных выражений и фраз, используемых в настоящем описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения, представлены ниже. При наличии очевидного несоответствия между использованием выражения в других частях настоящего описания и его определением, представленным в этом разделе, определение, данное в этом разделе, будет иметь преимущественную

силу.

Каждый из "G," "C," "A," "T" и "U", как правило, означает нуклеотид, который в качестве основания содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил соответственно. Однако, понятно, что выражение "рибонуклеотид", или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, который подробнее описан ниже, или заменяющий фрагмент в качестве заместителя. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без значительного изменения свойств в отношении спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, описанных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. Согласно другому примеру аденин и цитозин в любом месте в олигонуклеотиде могут быть замещены гуанином и урацилом соответственно, с образованием неоднозначного спаривания оснований G-U с целевой mRNA. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, пригодны для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении. Используемое в данном документе выражение "ALAS1" (также известное как ALAS-1; δаминолевулинатсинтаза 1; б-ALA синтаза 1; синтаза 5' -аминолевулиновой кислоты 1; ALAS-H; ALASH; ALAS-N; ALAS3; EC2.3.1.37; 5-аминолевулинатсинтаза, неспецифическая, митохондриальная; ALAS; MIG4; OTTHUMP00000212619; OTTHUMP00000212620; OTTHUMP00000212621; OTTHUMP00000212622; индуцирующий миграцию белок 4; ЕС 2.3.1) относится к кодируемому ядром митохондриальному ферменту, который является первым и, как правило, скорость-лимитирующим ферментом в пути биосинтеза гема млекопитающих. ALAS1 катализирует конденсацию глицина с сукцинил-КоА с образованием б-аминолевулиновой кислоты (ALA). Ген ALAS1 человека экспрессируется повсеместно, находится в хромосоме 3p21.1 и, как правило, кодирует последовательность из 640 аминокислот. В отличие от этого, ген ALAS-2, который кодирует изозим, экспрессируется только в эритроцитах, находится в хромосоме Хр 11.21 и, как правило, кодирует последовательность из 550 аминокислот. Используемое в данном документе выражение "белок ALAS1" означает любой вариант белка ALAS1 из любого вида (например, человека, мыши, низшего примата), а также его любые мутанты и фрагменты, которые сохраняют активность ALAS1. Аналогично, "транскрипт ALAS1" относится к любому варианту транскрипта ALAS1 из любого вида (например, человека, мыши, низшего примата). Последовательность mRNA-транскрипта ALAS1 человека можно найти как NM 000688.4 (фиг. 3A и 3B; SEO ID NO:1). Другой mRNA-транскрипт ALAS1 человека можно найти как NM 000688.5 (фиг. 4A и фиг. 4B; SEQ ID NO: 382). Уровень зрелого кодируемого белка ALAS1 регулируется гемом: высокие уровни гема подавляют зрелый фермент в митохондрии, в то время как низкие уровни гема активируют его. Было выявлено несколько образованных в результате альтернативного сплайсинга вариантов, кодирующих этот же белок.

Используемое в данном документе выражение "iRNA", "RNAi", "средство на основе iRNA" или "средство для RNAi" относится к средству, которое содержит РНК в том значении, в каком это выражение определено в данном документе, и которое опосредует целевое расщепление РНК-транскрипта, например, через путь с участием индуцируемого РНК комплекса сайленсинга (RISC). Согласно одному варианту осуществления iRNA, описанная в данном документе, влияет на ингибирование экспрессии ALAS1. Ингибирование экспрессии ALAS1 можно оценивать по снижению уровня mRNA ALAS1 или снижению уровня белка ALAS1. Использованное в данном документе выражение "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной в процессе транскрипции гена ALAS1, в том числе к mRNA, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной для того, чтобы выполнять роль субстрата для iRNA-направленного расщепления в этой части или рядом с этой частью. Например, целевая последовательность будет, как правило, составлять 9-36 нуклеотидов в длину, например, 15-30 нуклеотидов в длину, в том числе все поддиапазоны между ними. В качестве неограничивающих примеров целевая последовательность может состоять из 15-30 нуклеотидов, 15-26 нуклеотидов, 15-23 нуклеотидов, 15-21 нуклеотидов, 15-21 нуклеотида, 15-20 нуклеотидов, 15-19 нуклеотидов, 15-18 нуклеотидов, 15-17 нуклеотидов, 18-30 нуклеотидов, 18-26 нуклеотидов. 18-23 нуклеотидов. 18-22 нуклеотидов. 18-21 нуклеотида. 18-20 нуклеотидов. 19-30 нуклеотидов, 19-26 нуклеотидов, 19-23 нуклеотидов, 19-22 нуклеотидов, 19-21 нуклеотида, 19-20 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов, 20-26 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20-24 нуклеотидов, 20-23 нуклеотидов, 20-22 нуклеотидов, 20-21 нуклеотида, 21-30 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов, 21-24 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-27 нуклеотидов, 21-28 нуклеотидов, 2 леотидов, 21-23 нуклеотидов или 21-22 нуклеотидов.

Используемое в данном документе выражение "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь из нуклеотидов, которая характеризуется последовательностью, обозначаемой с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Используемое в данном документе, и если не указано иное, выражение "комплементарный" при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклео-

тидной последовательности означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут представлять собой жесткие условия, где жесткие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°С или 70°С в течение 12-16 ч с последующим отмыванием. Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, характерные для организма. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в iRNA, например, в dsRNA, описанных в данном документе, включают образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут быть указаны в данном документе как "полностью комплементарные" по отношению друг к другу. Однако при указании первой последовательности как "практически комплементарной" по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными, или они могут образовывать одну или несколько, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 ошибочно спаренных пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса вплоть до 30 пар оснований, с сохранением при этом способности гибридизоваться при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибировании экспрессии гена посредством пути RISC. Однако когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько однонитевых выступов, то такие выступы не будут считаться ошибочными спариваниями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину и другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может быть указана как "полностью комплементарная" для целей, описанных в данном документе.

"Комплементарные" последовательности, используемые в данном документе, могут также включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, образованных не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из не встречающихся в природе и модифицированных нуклеотидов, в такой степени, при которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности гибридизоваться. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначное или хугстиновское спаривание оснований G:U.

Выражения "комплементарный", "полностью комплементарный" и "практически комплементарный" в настоящем документе могут быть использованы по отношению к совпадению оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью dsRNA или между антисмысловой нитью средства на основе iRNA и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их использования.

Используемый в данном документе полинуклеотид, который "практически комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (mRNA) относится к полинуклеотиду, который практически комплементарен непрерывной части mRNA, представляющей интерес, (например, mRNA, кодирующей белок ALAS1). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA ALAS1, если последовательность практически комплементарна непрерывной части mRNA, кодирующей ALAS1. В качестве другого примера полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA ALAS1, если последовательность практически комплементарна непрерывной части mRNA, кодирующей ALAS1.

Выражение "двунитевая РНК" или "dsRNA," используемое в данном документе, относится к iRNA, которая включает молекулу РНК или комплекс молекул с гибридизированным участком дуплекса, который содержит две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновых кислот, которые будут указаны как характеризующиеся "смысловой" и "антисмысловой" ориентацией по отношению к целевой РНК. Участок дуплекса может быть любой длины, обеспечивающей специфическое разрушение требуемой целевой РНК, например, посредством пути RISC, но диапазон длины которой, как правило, будет составлять 9-36 пар оснований, например, 15-30 пар оснований в длину. С учетом дуплекса из 9-36 пар оснований, дуплекс может быть любой длины в этом диапазоне, например, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 или в любом поддиапазоне между ними, в том числе без ограничения 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований, 15-23 пары оснований, 15-22 пары оснований, 15-21 пару 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. dsRNA, образо-

ванные в клетке при обработке дайсером и подобными ферментами, как правило, находятся в диапазоне 19-22 пар оснований в длину. Одна нить участка дуплекса dsDNA содержит последовательность, которая практически комплементарна участку целевой РНК. Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть получены из одной молекулы РНК по меньшей мере с одним самокомплементарным участком, или могут быть получены из двух или более отдельных молекул РНК. Если участок дуплекса образован из двух нитей одной молекулы, то молекула может иметь участок дуплекса, отделенный однонитевой цепью нуклеотидов (называемой в данном документе "петля шпилька") между 3'-концом одной нити и 5'концом соответствующей другой нити, образующей дуплексную структуру. Петля "шпилька" может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид; согласно некоторым вариантам осуществления петля "шпилька" может содержать по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов. Если две практически комплементарные нити dsRNA составлены из отдельных молекул РНК, то эти молекулы не должны, но могут быть соединены ковалентной связью. Если эти две нити ковалетно соединены посредством способов, отличных от петли "шпильки", то соединяющая структура называется "линкер." Выражение "siRNA" также используют в данном документе для обозначения dsRNA, описанной выше.

Согласно другому варианту осуществления средство на основе iRNA может быть "однонитевой siRNA", которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой mRNA. Однонитевые средства для RNAi связываются с Argonaute 2 комплекса RISC, обладающим эндонуклеазной активностью, который затем расщепляет целевую mRNA. Однонитевые siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Конструирование и тестирование однонитевых siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima et al. (2012) Cell 150: 883-894, полное содержание каждого из которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки.

Любые из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе (например, последовательностей, представленные в табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 и 20 или в табл.21-40), можно применять в качестве однонитевой siRNA, описанной в данном документе или химически модифицированной способами, описанными в Lima et al., (2012) Cell 150: 883-894.

Согласно другому аспекту средство на основе РНК представляет собой "молекулу однонитевой антисмысловой РНК". Молекула однонитевой антисмысловой РНК комплементарна последовательности в целевой mRNA. Молекулы однонитевой антисмысловой РНК могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с mRNA и физического нарушения механизма трансляции, см., Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1: 347-355. Альтернативно, однонитевые антисмысловые молекулы ингибируют целевую mRNA путем гибридизации с целью и расщепления цели посредством расщепления с помощью RNaseH. Молекула однонитевой антисмысловой РНК может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину и иметь последовательность, которая комплементарна целевой последовательности. Например, молекула однонитевой антисмысловой РНК может содержать последовательность, которая включает по меньшей мере приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе, например, последовательностей, представленных в любой из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 и 20 или в табл. 21-40.

Специалист в данной области поймет, что выражение "молекула РНК" или "молекула рибонуклеиновой кислоты" охватывает не только молекулы РНК, экспрессируемые или встречающиеся в природе, но также аналоги и производные РНК, содержащие один или несколько рибонуклеотидных/рибонуклеозидных аналогов или производных, описанных в данном документе или известных из уровня техники. Строго говоря, "рибонуклеозид" включает нуклеозидное основание и рибозу, а "рибунуклеотид" представляет собой рибонуклеозид с одной, двумя или тремя фосфатными фрагментами. Однако, выражения "рибунуклеозид" и "рибонуклеотид", используемые в данном документе, можно считать эквивалентными. РНК можно модифицировать в отношении структуры нуклеотидных оснований, структуры рибозы или структуры рибозо-фосфатного остова, например, как описано ниже в данном документе. Однако, молекулы, содержащие рибонуклеозидные аналоги или производные, должны сохранять способность образовывать дуплекс. В качестве неограничивающих примеров молекула РНК также может включать по меньшей мере один модифицированный рибонуклеозид, в том числе без ограничения 2'-О-метил-модифицированный нуклеозид, нуклеозид, содержащий 5' фосфотиоатную группу, концевой нуклеозид, соединенный с группой производного холестерила или группой бисдециламида додекановой кислоты, запертый нуклеозид, ациклический нуклеозид, нуклеозид с удаленными основаниями, 2'дезокси-2'-фтормодифицированный нуклеозид, 2'-аминомодифицированный нуклеозид, модифицированный нуклеозид, морфолиновый нуклеозид, фосфорамидат или нуклеозид, содержащий не встречающиеся в природе основания, или их комбинацию. Альтернативно, молекула РНК может содержать по меньшей мере два модифицированных рибонуклеозида, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или более, вплоть до полной длины молекулы dsRNA. Модификации не обязательно должны быть одинаковыми для каждого из такого множества модифицированных рибонуклеозидов в молекуле РНК. Согласно одному варианту осуществления модифицированные РНК, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, представляют собой пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA), которые характеризуются способностью образовывать необходимую дуплексную структуру, и которые обеспечивают или опосредуют специфическое разрушение целевой РНК, например, посредством пути RISC.

Согласно одному аспекту модифицированный рибонуклеозид включает дезоксирибонуклеозид. В таком случае средство на основе iRNA может содержать один или несколько дезоксирибонуклеозидов, в например, дезоксирибонуклеозидный (дезоксирибонуклеозидные) щий(выступающие) конец(концы) или один или несколько дезоксинуклеозидов в двунитевой части dsR-NA. Согласно определенным вариантам осуществления процентное содержание в молекуле РНК дезоксирибонуклеозидов составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или выше (но не 100%) дезоксирибонуклеозидов, например, в одной или обеих нитях. Согласно другим вариантам осуществления выражение "iRNA" не охватывает двунитевую молекулу ДНК (например, встречающуюся в природе двунитевую молекулу ДНК или молекулу ДНК, содержащую 100% дезоксинуклеозидов). Согласно одному аспекту средство для РНК-интерференции включает однонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК для расщепления целевой РНК. Без углубления в теорию, длинная двунитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al., Genes Dev. 2001, 15:485). Дайсер, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature 409: 363). siRNA затем включаются в индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити направлять целевое распознавание (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой mRNA одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляет цель для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к однонитевой РНК, которая способствует образованию RISC-комплекса с осуществлением сайленсинга целевого гена.

Используемое в данном документе выражение "нуклеотидный выступающий конец" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры iRNA, например, dsRNA. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, то образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA может содержать выступающий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; альтернативно, выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступающий конец может содержать нуклеотидный/нуклеозидный аналог или состоять из нуклеотидного/нуклеозидного аналога, в том числе дезоксинуклеотида/нуклеозида. Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в пределах смысловой нити, антисмысловой нити или их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах или антисмысловой, или смысловой нити dsRNA.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить dsRNA имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. Согласно одному варианту осуществления смысловая нить dsRNA имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. Согласно другому варианту осуществления один или несколько нуклеотидов выступающего конца замещают нуклеозидтрифосфатом.

Выражение "тупой конец" или "с тупыми концами", используемые в данном документе в отношении dsRNA, означают, что на данном терминальном конце dsRNA отсутствуют неспаренные нуклеотиды или нуклеотидные аналоги, т. е., отсутствует нуклеотидный выступающий конец. Один или оба конца dsRNA могут быть тупыми. Если оба конца dsRNA являются тупыми, то dsRNA называется dsRNA с тупыми концами. Для внесения ясности, dsRNA "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является тупой по обоим концам, т. е., ни на одном из концов молекулы нет нуклеотидного выступающего конца. Чаще всего такая молекула будет двунитевой по всей длине.

Выражение "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например dsRNA, которая включает участок, который практически комплементарен целевой последовательности. Используемое в данном документе выражение "участок комплементарности" относится к участку антисмысловой нити, который практически комплементарен последовательности, например, целевой последовательности, определенной выше. Если участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, то ошибочные спаривания могут находиться во внутренних или концевых участках молекулы. Как правило, допустимые в наибольшей степени ошибочные спаривания находятся в концевых участках, например, по 5, 4, 3 или 2 нуклеотиду 5'- и/или 3'-конца.

Выражение "смысловая нить", или "сопровождающая нить", используемое в данном документе, относится к нити iRNA, которая включает участок, практически комплементарный участку антисмысловой нити, как это выражение определено выше.

Используемое в данном документе выражение "SNALP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. SNALP представляет собой везикулу из липидов, покрывающих внутреннее пространство со сниженным водным содержимым, содержащий нуклеиновую кислоту, такую как iRNA, или плазмиду, из которой транскрибируется iRNA. SNALP описаны, например, в опубликованных патентных заявках США №№ 20060240093, 20070135372 и международной заявке № WO 2009082817. Эти заявки включены в данный документ при помощи ссылки по всей своей полноте.

Специалистам в данной области понятно, что "введение в клетку" в отношении iRNA означает облегчение или осуществление захвата или абсорбции клеткой. Абсорбция или захват iRNA может происходить путем спонтанных диффузионных или активных клеточных процессов, или при помощи вспомогательных средств или приспособлений. Значение этого выражения не ограничено клетками in vitro; iR-NA также может быть "введена в клетку," при этом клетка является частью живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, в случае in vivo доставки iRNA может быть инъецирована в определенный участок ткани или введена системно. In vivo доставку также можно осуществлять с помощью системы доставки на основе P-глюкана, такой как описанные в патентах США №№ 5032401 и 5607677, и публикации патента США № 2005/0281781, которые включены в данный документ при помощи ссылки во всей свой полноте. In vitro введение в клетку включает известные из уровня техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже в данном документе или известны из уровня техники.

Используемое в данном документе выражение "модулировать экспрессию" относится по меньшей мере к частичному "ингибированию" или частичной "активации" экспрессии гена ALAS1 в клетке, обработанной композицией на основе iRNA, описанной в данном документе, относительно экспрессии ALAS1 в контрольной клетке. Контрольная клетка включает необработанную клетку, или клетку, обработанную нецелевой контрольной iRNA.

Выражения "активировать", "усиливать", "активировать экспрессию", "повышать экспрессию" и т. п., в части данного документа, где они относятся к гену ALAS1, относятся по меньшей мере к частичной активации экспрессии гена ALAS1, которая проявляется в повышении количества mRNA ALAS I, которую можно выделить из первой клетки или группы клеток или выявить в первой клетке или группе клеток, в которой ген ALAS1 транскрибируется, и которая была обработана или которые были обработаны с повышением экспрессии гена ALAS1 относительно второй клетки или группы клеток, практически идентичных первой клетке или группе клеток, но которая не была обработана или которые не были обработаны подобным образом (контрольные клетки).

Согласно одному варианту осуществления экспрессия гена ALAS1 активирована по меньшей мере приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% путем введения iRNA, описанной в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления ген ALAS1 активирован по меньшей мере приблизительно на 60, 70 или 80% путем введения iRNA, описанной в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессия гена ALAS1 активирована по меньшей мере приблизительно на 85, 90 или 95% или более путем введения iRNA, описанной в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессия гена ALAS1 повышена по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более в клетках, обработанных iRNA, описанной в данном документе, относительно экспрессии в необработанных клетках. Активация экспрессии малыми dsRNA описана, например, в Li et al., 2006 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:17337-42, и в US20070111963 и US2005226848, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Выражения "осуществлять сайленсинг", "ингибировать экспрессию", "осуществлять негативную регуляцию", "подавлять экспрессию" и т. п. в части данного документа, где они относятся к гену ALAS1, относятся по меньшей мере к частичному подавлению экспрессии гена ALAS1, что оценивают, например, по экспрессии mRNA ALAS1, экспрессии белка ALAS1 или другому показателю, функционально связанному с экспрессией гена ALAS1 (например, концентрациям ALA или PBG в плазме или моче). Например, ингибирование экспрессии ALAS1 может проявляться в снижении количества mRNA ALAS I, которая может быть выделена из первой клетки или группы клеток или выявлена в первой клетке или группе клеток, в которых ген ALAS1 транскрибируется, и которая была обработана или которые были обработаны так, что экспрессия гена ALAS1 ингибируется относительно контроля. Контролем может быть вторая клетка или группа клеток, практически идентичная первой клетке или группе клеток, за исключением того, что вторая клетка или группа клеток не была обработана подобным образом (контрольные клетки). Степень ингибирования, как правило, выражена в виде процента контрольного уровня, например,

$$\frac{\left(\text{mRNA в контрольных клетках}\right) - \left(\text{mRNA в обработанных клетках}\right)}{\left(\text{mRNA в контрольных клетках}\right)} \bullet 100\%$$

Альтернативно, степень ингибирования может быть выражена с точки зрения снижения показателя, который функционально связан с экспрессией гена ALAS1, например количества белка, кодируемого геном ALAS 1, или уровня одного или нескольких порфиринов. Снижение показателя, функционально

связанного с экспрессией гена ALAS 1, подобным образом может быть выражено в виде процента от контрольного уровня. В целом, сайленсинг гена ALAS1 можно определять в любой клетке, экспрессирующей ALAS1 либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и при помощи любого подходящего анализа. Однако, если требуется информация для определения, ингибирует ли данная iRNA экспрессию гена ALAS 1 в определенной степени и, таким образом, охватывается настоящим изобретением, роль такой информации будут выполнять анализы, представленные ниже в примерах.

Например, в некоторых случаях экспрессия гена ALAS1 подавляется по меньшей мере приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% путем введения iRNA, описанной в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам осуществления ген ALAS1 подавляется по меньшей мере на приблизительно 60, 65, 70, 75 или 80% путем введения iRNA, описанной в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам осуществления ген ALAS 1 подавляется по меньшей мере приблизительно на 85, 90, 95, 98 или 99% путем введения iRNA, описанной в настоящем изобретении.

Используемые в контексте экспрессии ALAS1 выражения "лечить", "осуществлениея лечения", "лечение" т.п. относятся к ослаблению или облегчению патологических процессов, связанных с экспрессией ALAS 1 (например, патологических процессов, включающих порфирины или нарушения в рамках порфиринового пути, такие как, например, порфирии). В контексте настоящего изобретения в части, касающейся любых из других состояний, упомянутых ниже в данном документе (кроме патологических процессов, связанных с экспрессией ALAS1), выражения "лечить", "лечение" и т.п. означают предупреждение, облегчение или ослабление по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким состоянием, или замедление или устранение прогрессирования или прогнозирование прогрессирования такого состояния. Например, способы, описанные в данном документе, при использовании для лечения порфирии, могут служить для облегчения или предупреждения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией (например, болевых ощущений), снижения тяжести или частоты приступов, ассоциированных с порфирией, снижения вероятности того, что приступ, состоящий из одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, возникнет при воздействии провоцирующего фактора, укорочения приступа, связанного с порфирией, и/или снижения риска развития состояний, ассоциированных с порфирией (например, гепатоцеллюлярного рака или нейропатии (например, прогрессирующей нейропатии)). Таким образом, если контекст явно не указывает на иное, предполагается, что выражения "лечить," "лечение" и т.п. охватывают профилактику, например предупреждение нарушения и/или симптомов нарушений, связанных с экспрессией ALAS1.

Под выражением "снижать" в контексте маркера или симптома нарушения понимают статистически или клинически значимое снижение такого уровня. Снижение, например, может составлять по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или более и, как правило, вплоть до уровня, соответствующего уровню в пределах нормы для индивида без такого нарушения.

Используемые в данном документе фразы "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество" относятся к количеству, которое дает терапевтическое преимущество при лечении, предупреждении или контроле патологических процессов, связанных с экспрессией ALAS1. Конкретное количество, которое является терапетически эффективным, может быть легко определено рядовым врачом, и может варьировать в зависимости от факторов, известных в уровне техники, таких как, например, тип патологического процесса, история болезни и возраст пациента, стадия патологического процесса и введение других средств.

Используемое в данном документе выражение "фармацевтическая композиция" содержит фармакологически эффективное количество iRNA и фармацевтически приемлемый носитель. Используемое в данном документе выражение "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относится к такому количеству iRNA, эффективному для получения предполагаемого фармакологического, терапевтического или превентивного результата. Например, в способе лечения нарушения, связанного с экспрессией ALAS1 (например, в способе лечения порфирии), эффективное количество включает количество, эффективное для облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, количество, эффективное для снижения частоты приступов, количество, эффективное для снижения вероятности того, что приступ, состоящий из одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, возникнет при воздействии провоцирующего фактора, или количество, эффективное для снижения риска развития состояний, ассоциированных с порфирией (например, нейропатии (например, прогрессирующей нейропатии), гепатоцеллюлярного рака). Например, если определенное клиническое лечение считается эффективным, когда имеет место по меньшей мере 10% снижение измеряемого показателя, ассоциированного с заболеванием или нарушением, то терапевтически эффективное количество лекарственного средства для лечения этого заболевания или нарушения представляет собой количество, необходимое для получения по меньшей мере 10% снижения этого значения. Например, терапевтически эффективное количество iRNA, нацеленной на ALAS1, может снижать уровни белка ALAS1 на любое измеряемое количество, например по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50%.

Выражение "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю для введения терапевтического средства. Такие носители включают без ограничения солевой раствор, забуференный солевой

раствор, декстрозу, воду, глицерол, этанол и их комбинацию. Выражение, в частности, исключает среду для культивирования клеток. Для лекарственных средств, вводимых перорально, фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения фармацевтически приемлемые вспомогательные средства, такие как инертные разбавители, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, смазывающие средства, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты. Подходящие инертные разбавители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция и лактозу, в то время как кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются подходящими средствами для улучшения распадаемости. Связывающие средства могут включать крахмал и желатин, в то время как смазывающие средства, если присутствуют, будут представлять собой, как правило, стеарат магния, стеариновую кислоту и тальк. При необходимости, таблетки могут быть покрыты веществом, таким как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для задержки всасывания в желудочнокишечном тракте. Средства, включенные в составы лекарственных средств, дополнительно описаны ниже в данном документе.

Выражение "приблизительно" в отношении числа или числового диапазона означает, что указанное число или числовой диапазон является приближением в пределах колебания экспериментальных данных (или в пределах статистической ошибки эксперимента), и, таким образом, число или числовой диапазон могут варьировать, например, от 1 до 15% указанного числа или числового диапазона.

## II. Средства на основе iRNA

В данном документе описаны средства на основе iRNA, которые ингибируют экспрессию гена ALAS1. Согласно одному варианту осуществления средство на основе iRNA включает молекулы двунитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена ALAS1 в клетке или у субъекта (например, у млекопитающего, например, у человека с порфирией), где dsRNA включает антисмысловую нить с участком комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части mRNA, образованной в результате экспрессии гена ALAS1, и где участок комплементарности составляет 30 нуклеотидов или менее в длину, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, и где dsRNA при контакте с клеткой, экспрессирующей ген ALAS1, ингибирует экспрессию гена ALAS1 по меньшей мере на 10%, при анализе, например, с помощью PCR или способа на основе разветвленной ДНК (bDNA), или с помощью способа на основе определения белков, такого как вестерн-блоттинг. Согласно одному варианту осуществления средство на основе iRNA активирует экспрессию гена ALAS1 в клетке или у млекопитающего. Экспрессию гена ALAS1 в культуре клеток, таких как клетки COS, клетки HeLa, первичные гепатоциты, клетки HepG2, первичные культивируемые клетки, или в биологическом образце от субъекта, можно анализировать путем измерения уровней mRNA ALAS1, например, с помощью анализа bDNA или TaqMan, или путем измерения уровней белка, например, с помощью имунофлуоресцентного анализа, с применением, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA включает две нити РНК, которые достаточно комплементарны для гибридизации, с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) включает участок комплементарности, который практически комплементарен, и, как правило, полностью комплементарен целевой последовательности, полученной из последовательности mRNA, образованной в ходе экспрессии гена ALAS1. Другая нить (смысловая нить) включает участок, который комплементарен антисмысловой нити, таким образом, что две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении при подходящих условиях. Как правило, дуплексная структура составляет 15-30 включительно, чаще 18-25 включительно, еще чаще 19-24 включительно, и чаще всего 19-21 пару оснований в длину включительно. Аналогично, участоккомплементарности целевой последовательности составляет 15-30 включительно, чаще 18-25 включительно, еще чаще 19-24 включительно, и чаще всего 19-21 нуклеотид в длину включительно. Согласно некоторым вариантам осуществления dsRNA составляет 15-20 нуклеотидов в длину включительно, и согласно другим вариантам осуществления dsRNA составляет 25-30 нуклеотидов в длину включительно. Специалисту в данной области будет понятно, что целевой участок РНК, предназначенный для расщепления, зачастую будет представлять собой часть более крупной молекулы РНК, обычно молекулы mRNA. При необходимости, "часть" целевой mRNA представляет собой непрерывную последовательность целевой mRNA достаточной длины, чтобы быть субстратом для RNAi-направленного расщепления (т.е., расщепления посредством пути RISC). dsRNA с дуплексами по меньшей мере из 9 пар оснований могут при некоторых обстоятельствах опосредовать RNAi-направленное расщепление РНК. Наиболее часто цель будет составлять по меньшей мере 15 нуклеотидов в длину, например 15-30 нуклеотидов в длину.

Специалисту в данной области также будет понятно, что участок дуплекса представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например, участок дуплекса из 9-36, например, 15-30 пар оснований. Таким образом, согласно одному варианту осуществления в том случае, когда он процессирован до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на необходимую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс из молекул РНК с участком дуплекса из более 30 пар оснований представляет собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что согласно одному варианту осуществления miRNA представляет собой dsRNA. Согласно другому варианту осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. Согласно другому варианту осуществления средство на основе iRNA, пригодное для нацеливания экспрессии ALAS1, не

образуется в целевой клетке путем расщепления более крупной dsRNA.

dsRNA, описанная в данном документе, может дополнительно включать один или несколько однонитевых нуклеотидных выступающих концов. dsRNA может быть синтезирована при помощи стандартных способов, известных из уровня техники, дополнительно описанных ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступные, например, от Biosearch, Applied Biosystems, Inc. Согласно одному варианту осуществления ген ALAS1 представляет собой ген ALAS1 человека. Согласно другому варианту осуществления ген ALAS1 представляет собой ген ALAS1 мыши или крысы.

Согласно конкретным вариантам осуществления первая последовательность представляет собой смысловую нить dsRNA, которая включает смысловую последовательность, раскрытую в данном документе, например, в табл. 21-40, и вторая последовательность представляет собой антисмысловую нить dsRNA, которая включает антисмысловую последовательность, раскрытую в данном документе, например, в табл. 21-40.

Согласно конкретным вариантам осуществления первая последовательность представляет собой смысловую нить dsRNA, которая включает смысловую последовательность из табл. 2 или таблицы 3, и вторая последовательность представляет собой антисмысловую нить dsRNA, которая включает антисмысловую последовательность из табл. 2 или 3. Согласно вариантам осуществления первая последовательность представляет собой смысловую нить dsRNA, которая включает смысловую последовательность из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 или 15, и вторая последовательность представляет собой антисмысловую нить dsRNA, которая включает антисмысловую последовательность из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 или 15. Согласно вариантам осуществления первая последовательность представляет собой смысловую нить dsRNA, которая включает смысловую последовательность из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 или 20, и вторая последовательность представляет собой антисмысловую последовательность из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 или 20, и вторая последовательность из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 или 20, и вторая последовательность из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 или 20.

Согласно одному аспекту dsRNA может включать по меньшей мере смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, при этом смысловую нить выбирают из смысловых последовательностей, представленных в данном документе, например, в табл. 21-40, и соответствующую антисмысловую нить смысловой нити выбирают из антисмысловых последовательностей, представленных в данном документе, например, в табл. 21-40.

Согласно одному аспекту dsRNA может включать по меньшей мере смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, при этом смысловую нить выбирают из группы последовательностей, представленных в табл. 2 и 3, и соответствующую антисмысловую нить смысловой нити выбирают из табл. 2 и 3. Согласно дополнительному аспекту dsRNA может включать по меньшей мере смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, при этом смысловую нить выбирают из группы последовательностей, представленных в табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 и 15, и соответствующую антисмысловую нить смысловой нити выбирают из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 и 15. Согласно дополнительному аспекту dsR-NA может включать по меньшей мере смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, при этом смысловую нить выбирают из группы последовательностей, представленных в таблицах 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 и 20, и соответствующую антисмысловую нить смысловой нити выбирают из табл. 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 и 20.

Согласно вариантам осуществления iRNA представляет собой AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892 или AD-60419 (например, в том числе нуклеотидную последовательность и/или одну или несколько (например, все) из модификаций упомянутых выше dsRNA). Согласно вариантам осуществления iRNA содержит антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности (в том числе одной или нескольких (например, всех модификаций)), выбранной из антисмысловой последовательности AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892 или AD-60419. Согласно вариантам осуществления iRNA содержит смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности (и/или одной или нескольких (например, всех модификаций)), выбранной из AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892 или AD-60419.

Согласно вариантам осуществления iRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит по-

следовательность или состоит из последовательности UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU или UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит последовательность или состоит из последовательности CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA. Согласно вариантам осуществления один или несколько нуклеотидов антисмысловой нити и/или смысловой нити модифицированы, как описано в данном документе.

Согласно вариантам осуществления iRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60489 (и/или одной или нескольких (например, всех) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489).

Согласно вариантам осуществления iRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60519, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60519 (и/или одной или нескольких (например, всех) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489).

Согласно вариантам осуществления iRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-61193, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-61193 (и/или одной или нескольких (например, всех) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489).

Согласно вариантам осуществления iRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60819, и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60819 (и/или одной или нескольких (например, всех) из модификаций смысловой нити и/или антисмысловой нити AD-60489).

Согласно вариантам осуществления представлена iRNA для ингибирования экспрессии ALAS1, где dsRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая содержит антисмысловую последовательность или состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819 (или соответствующей немодифицированной антисмысловой последовательности), и/или (ii) смысловую нить, которая содержит смысловую последовательность или состоит из смысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819 (или соответствующей немодифицированной антисмысловой последовательности). Согласно вариантам осуществления iRNA содержит (i) антисмысловую нить, которая состоит из антисмысловой последовательности AD-60489, AD-61193 или AD-60819, и/или (ii) смысловую нить, которая состоит из смысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819, за исключением того, что антисмысловая нить и/или смысловая нить dsRNA отличается 1, 2 или 3 нуклеотидами от соответствующей антисмысловой и/или смысловой последовательности AD-60489, AD-60519, AD-61193 или AD-60819.

Последовательности и модификации AD-60489, AD-60519, AD-61193 и AD-60819, раскрытые в данном документе, показаны в табл. 44.

Согласно одному варианту осуществления iRNA представляет собой ALN-60519. ALN-60519 представляет собой химически синтезированный двунитевой олигонуклеотид, ковалентно связанный с лигандом, содержащим три остатка N-ацетилгалактозамина (GalNAc) (обозначенных на фиг. 57). Согласно одному варианту осуществления все нуклеотиды ALN-60519 являются 2'-ОМе или 2'-Гмодифицированными и соединены посредством 3'-5'-фосфодиэфирных связей с образованием сахарофосфатного остова олигонуклеотида. Смысловая нить и антисмысловая нить ALN-60519 содержат 21 и 23 нуклеотида соответственно. 3'-конец смысловой нити ALN-60519 конъюгирован с фрагментом GalNAc с тремя разветвлениями (называемым в данном документе L96) посредством фосфодиэфирной связи. Антисмысловая нить содержит четыре фосфотиоатных связи - две на 3'-конце и две на 5'-конце.

Смысловая нить ALN-60519 содержит две фосфотиоатных связи на 5'-конце. 21 нуклеотид смысловой нити ALN-60519 гибридизируется с комплементарным 21 нуклеотидом антисмысловой нити, образуя, таким образом, 21 пару нуклеотидных оснований и выступающий конец из двух оснований на 3'-конце антисмысловой нити. Две одиночные нити, смысловая нить и антисмысловая нить ALN-60519 могут быть синтезированы при помощи стандартного твердофазного синтеза олигонуклеотидов, с использованием стандартной химической структуры фосфородиамита с 5'-гидроксильной группой, защищенной в виде диметокситрифенилметилового (DMT) эфира. Каждая нить может быть собрана от 3'-5'-конца последовательным добавлением защищенных нуклеозидных фосфорамидитов.

Согласно этим аспектам одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей практически комплементарна последовательности mRNA, полученной в результате экспрессии гена ALAS1. Соответственно dsRNA будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан в данном документе как смысловая нить, и второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая нить. Описанные в другой части в данном документе и известные из уровня техники комплементарные последовательности dsRNA также мо-

гут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от пребывания с составе отдельных олигонуклеотидов.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из 20-23, в частности, из 21 пары оснований были признаны особенно эффективными в индуцировании РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Однако другими исследователями было обнаружено, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными. Согласно вариантам осуществления, описанным выше, в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, представленных в таблицах в данном документе, dsRNA, описанные в данном документе, могут включать по меньшей мере одну нить длиной минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предполагать, что более короткие дуплексы с одной из последовательностей, раскрытых в данном документе, за исключением лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть так же эффективны относительно dsRNA, описанных выше. Поэтому, согласно настоящему изобретению рассматриваются dsRNA с частичной последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, раскрытых в данном документе, и различающихся их способностью ингибировать экспрессию гена ALAS1 не более чем на 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность.

Кроме того, РНК, представленные в таблицах в данном документе, идентифицируют сайт в ALAS1транскрипте, который восприимчив к RISC-опосредованному расщеплению. Соответственно, настоящее изобретение также описывает iRNA, которые нацелены на одну из таких последовательностей. В контексте данного документа подразумевают, что iRNA нацелена на конкретный сайт РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте в этом конкретном сайте. Такая iRNA будет, как правило, включать по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в данном документе, например, в таблицах 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18, 20 и в табл. 21-40, объединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, полученными из участка, прилегающего к выбранной последовательности в гене ALAS1.

Хотя целевая последовательность, как правило, составляет 15-30 нуклеотидов в длину, имеет место широкий спектр пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направления расщепления любой определенной целевой РНК. Ряд пакетов программного обеспечения и рекомендации, изложенные в данном документе, служат в качестве руководства для идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного целевого гена, но также можно воспользоваться эмпирическим подходом, в котором "окно" или "рамку" данного размера (в качестве неограничивающего примера 21 нуклеотид) буквально или условно (в том числе, например, in silico) накладывают на целевую последовательность РНК для идентификации последовательностей в размерном диапазоне, которые могут выполнять роль целевых последовательностей. Передвигая "окно" последовательности постепенно на один нуклеотид выше или ниже относительно исходного расположения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, до тех пор, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для каждого данного выбранного целевого размера. С помощью этого способа, вместе с системным синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с помощью анализов, описанных в данном документе, или известных из уровня техники) для идентификации таких последовательностей с оптимальными качествами, можно идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании средством на основе iRNA опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии целевых генов. Таким образом, в то время как идентифицированные последовательности, например, в таблицах в данном документе, представляют эффективные целевые последовательности, предполагается, что дополнительная оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута путем постепенного "перемещения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно определенных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Также предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в таблицах в данном документе, дополнительная оптимизация может быть достигнута целенаправленно либо добавлением, либо удалением нуклеотидов для получения более длинных или более коротких последовательностей, и тестированием таких последовательностей и последовательностей, полученных путем перемещения окна более длинного или более короткого размера выше или ниже относительно целевой РНК от данной точки. Также объединение этого подхода для получения новых кандидатных целей вместе с тестированием эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известного из уровня техники или описанного в данном документе, может иметь результатом дополнительные улучшения в эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать, например, введением модифицированных нуклеотидов, описанных в данном документе или известных из уровня техники, добавлением или изменениями выступающего конца, или другими модификациями, известными из уровня техники и/или описанными в данном документе для дополнительной оптимизации молекулы (например, повышения стабильности в сыворотке или периода полужизни в крови, повышения термостабильности, улучшения трансмембранной доставки, нацеливания на конкретную локацию или тип клеток, повышения степени взаимодействия с

ферментами в рамках пути сайленсинга, повышения уровня высвобождения из эндосом и т. д.) в качестве ингибитора экспрессии.

iRNA, описанная в данном документе, может содержать одно или несколько ошибочно спаренных оснований относительно целевой последовательности. Согласно одному варианту осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибочно спаренных оснований. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибочно спаренные основания относительно целевой последовательности, предпочтительно, чтобы эта область ошибочно спаренных оснований не располагалась в центре участка комплементарности. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибочно спаренные основания относительно целевой последовательности, предпочтительно, чтобы ошибочно спаренное основание было ограничено расположением по меньшей мере в последних 5 нуклеотидах либо от 5'- либо 3'-конца участка комплементарности. Например, для средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов, нить РНК которой комплементарна участку гена ALAS1, нить РНК, как правило, не содержит ошибочно спаренного основания в центральных 13 нуклеотидах. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные из уровня техники, можно применять для определения того, является ли iRNA, содержащая ошибочно спаренное основание относительно целевой последовательности, эффективной в ингибировании экспрессии гена ALAS1. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибочно спаренными основаниями в ингибировании экспрессии гена ALAS1 является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в гене ALAS1 характеризуется вариацией полиморфных последовательностей в популяции.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один конец dsRNA имеет однонитевой нуклеотидный выступающий конец из 1-4, как правило 1 или 2 нуклеотидов. dsRNA по меньшей мере с одним нуклеотидным выступающим концом неожиданным образом характеризуются более высокими ингибиторными свойствами относительно своих аналогов с тупыми концами. Согласно еще одному варианту осуществления РНК из iRNA, например, dsRNA, химически модифицирована для усиления стабильности или других предпочтительных характеристик. Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными из уровня техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et at. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен, таким образом, в данный документ при помощи ссылки. Модификации включают, например, (а) концевые модификации, например 5'концевые модификации (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи и т.д.), 3'-концевые модификации (конъюгацию, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.), (b) модификации оснований, например, замещение стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару оснований с широким спектром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленными основаниями) или конъюгированные основания, (с) модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении, или наличие ациклического сахара) или замещение сахара, а также (d) модификации остовов, в том числе модификацию или замещение фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений РНК, пригодных в настоящем изобретении, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или отличные от природных межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными скелетами включают, среди прочих, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. Применительно к настоящему описанию, а также некоторым упоминаниям из уровня техники, модифицированные РНК без атома фосфора в пределах их межнуклеозидного остова также могут считаться олигонуклеозидами. Согласно конкретным вариантам осуществления модифицированные РНК будут содержать атом фосфора в их межнуклеозидном остове.

Остовы модифицированной РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другой алкил-фосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и борофосфаты с типичными 3'-5'-связями, их 2'-5'-связанные аналоги и таковые, имеющие обратную ориентацию, где соседние пары нуклеозидных единиц связываются 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение приведенных выше фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821;5541316; 5550111;5563253; 5571799;5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029 и патент США RE39464, каждый из которых включен в даннй документ при помощи ссылки.

Остовы модифицированных РНК, которые не имеют атом фосфора, включают остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из части нуклеозида, содер-

жащей сахар); силоксановые скелеты; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкен остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленгидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие части смешанных компонентов N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение приведенных выше олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938;5434257; 5466677;5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

В других миметиках РНК, подходящих или предполагаемых для применения в iRNA, как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных единиц, замещены новыми группами. Единицы оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает очень хорошими свойствами для гибридизации, называется пептидо-нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях РNA остов РНК, содержащий сахар, замещен содержащим амид остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и соединяются непосредственно или опосредованно с атомами аза-азота в амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение соединений РNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки. Дополнительное описание соединений РNA можно найти, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотио-атными остовами и олигонуклеозиды с остовами с гетероатомами и, в частности, --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--[известный как метилен (метилимино) или ММІ скелет], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- и --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- [где нативный скелет сложного фосфодиэфира представлен как --O--P--О--CH<sub>2</sub>--] упомянутого выше патента США № 5489677 и амидные остовы упомянутого выше патента США № 5602240. Согласно некоторым вариантам осуществления РНК, описанные в настоящем документе, характеризуются структурами морфолинового скелета согласно упомянутому выше патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько фрагментов с замещенным сахаром. iRNA, например, dsRNA, описанные в настоящем документе, могут включать в 2'-положении одно из следующих: ОН; F; О-, S- или N-алкил; О-, S- или N-алкенил; О-, S- или N-алкинил или О-алкил-О-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными  $C_1$ - $C_{10}$ алкилом или  $C_2$ - $C_{10}$ алкенилом и алкинилом. Иллюстративные пригодные 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 п и m составляют от 1 до приблизительно 10. Согласно другим вариантам осуществления dsRNA включают в 2'-положении одно из следующих: низший  $C_1$ - $C_{10}$ алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или О-аралкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и другие заместители с подобными свойствами. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), т.е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'диметиламинооксиэтокси, т.е. группа  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ , также известная как 2'-DMAOE, как описано ниже в примерах в данном документе, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известный из уровня техники как 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-О-- $\mathrm{CH}_2$ --О-- $\mathrm{CH}_2$ --N( $\mathrm{CH}_2$ )2, также описанный ниже в примерах в данном документе.

Согласно другим вариантам осуществления средство на основе iRNA содержит один или несколько (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) ациклических нуклеотидов (или нуклеозидов). Согласно определенным вариантам осуществления смысловая нить или антисмысловая нить, или как смысловая нить, так и антисмысловая нить, включают менее пяти ациклических нуклеотидов на нить (например, четыре, три, два или один ациклический нуклеотид на нить). Один или несколько ациклических нуклеотидов могут быть расположены, например, в двунитевом участке смысловой или антисмысловой нити, или обеих нитей; на 5'-конце, 3'-конце, как 5'-, так и 3'-концах смысловой или антисмысловой нити, или обеих нитей средства на основе iRNA.

Согласно одному варианту осуществления один или несколько ациклических нуклеотидов находятся в положениях 1-8 смысловой или антисмысловой нити, или обеих. Согласно одному варианту осуществления один или несколько ациклических нуклеотидов находятся в антисмысловой нити в положениях 4-10 (например, положениях 6-8) от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно другому варианту осуществления один или несколько ациклических нуклеотидов находятся на одном или обеих 3'-концевых выступающих концах средства на основе iRNA.

Выражение "ациклический нуклеотид" или "ациклический нуклеозид", используемое в данном документе, относится к любому нуклеотиду или нуклеозиду с ациклическим сахаром, например, ациклической рибозой. Иллюстративный ациклический нуклеотид или нуклеозид может включать нуклеотидное основание, например, встречающееся в природе или модифицированное нуклеотидное основание (например, нуклеотидное основание, описанное в данном документе). Согласно определенным вариантам осуществления связь между любыми из углеродов рибозы (С1, С2, С3, С4 или С5), независимо или в комбинации, отсутствует со стороны нуклеотида. Согласно одному варианту осуществления связь между углеродами С2-С3 рибозного кольца отсутствует, например, мономер ациклического 2'-3'-секонуклеотида. Согласно другим вариантам осуществления связь между С1-С2, С3-С4 или С4-С5 отсутствует (например, мономер 1'-2', 3'-4' или 4'-5'-секо-нуклеотида). Иллюстративные ациклические нуклеотиды раскрыты в US 8314227, включенном в данный документе при помощи ссылки во всей своей полноте. Например, ациклический нуклеотид может включать любой из мономеров D-J на фиг. 1-2 согласно US 8314227. Согласно одному варианту осуществления ациклический нуклеотид включает следующий мономер:

где основание представляет собой нуклеотидное основание, например, встречающееся в природе или модифицированное нуклеотидное основание (например, нуклеотидное основание, описанное в данном документе).

Согласно определенным вариантам осуществления ациклический нуклеотид может быть модифицированным или дериватизированным, например, при объединении ациклического нуклеотида с другим фрагментом, например, лигандом (например, GalNAc, холестерином в качестве лигандов), алкилом, полиамином, сахаром, полипептидом, среди прочих.

Согласно другим вариантам осуществления средство на основе iRNA включает один или несколько ациклических нуклеотидов и одну или несколько LNA (например, LNA, описанную в данном документе). Например, один или несколько ациклических нуклеотидов и/или одна или несколько LNA могут находиться в смысловой нити, антисмысловой нити или обеих. Число ациклических нуклеотидов в одной нити может быть одинаковым или может отличаться от числа LNA в противоположной нити. Согласно определенным вариантам осуществления смысловая нить и/или антисмысловая нить содержит менее пяти LNA (например, четыре, три, два или одну LNA), расположенных в двунитевом участке или 3'-выступающем конце. Согласно другим вариантам осуществления одна или две LNA расположены в двунитевом участке 3'-выступающего конца смысловой нити. Альтернативно, или в комбинации, смысловая нить и/или антисмысловая нить содержит менее пяти ациклических нуклеотидов (например, четыре, три, два или один ациклический нуклеотид) в двунитевом участке или 3'-выступающем конце. Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства на основе iRNA содержит одну или две LNA в 3'-выступающем конце смысловой нити, и один или два ациклических нуклеотида в двунитевом участке антисмысловой нити (например, в положениях 4-10 (например, положениях 6-8) от 5'-конца антисмысловой нити) средства на основе iRNA.

Согласно другим вариантам осуществления включение одного или нескольких ациклических нуклеотидов (отдельно или в дополнение к одной или нескольким LNA) в средство на основе iRNA приводит к одному или нескольким (или всем) из следующего: (i) снижению нецелевого эффекта; (ii) снижению участия сопровождающей нити в RNAi; (iii) повышению специфичности ведущей нити к ее целевой mRNA; (iv) снижению нецелевого эффекта microRNA; (v) повышению стабильности или (vi) повышению устойчивости к разрушению молекулы iRNA.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях РНК из iRNA, в частности, в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных dsRNA и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики Сахаров, такие как циклобутиловые фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение таких структур с модифицированными сахарами, включают без ограничения патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878;5446137;5466786;5514785;5519134;5567811; 5576427;5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920, некоторые из которых принадлежат авторам настоящей заявки и каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

iRNA также может включать в себя модификации и замещения нуклеотидного основания (часто называемого в уровне техники просто "основанием"). Используемые в данном документе выражения "немодифицированные" или "природные" нуклеотидные основания включают пуриновые основания аденин

(A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают другие синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как 5-метилцитозин (5-те-С), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 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-, 8тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности, 5-бром-, 5трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в Моdified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые в Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, а также раскрытые в Sanghvi Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеотидных оснований особенно пригодны для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и О-6 замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно при комбинировании с 2'-О-метоксиэтильными модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение определенных указанных выше модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают без ограничения указанный выше патент США №3687808, а также патенты США №№ 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066;5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5681941; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки, и патент США № 5750692, также включенный в данный документ при помощи ссылки.

РНК из iRNA также может быть модифицирована с включением одной или нескольких (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) запертых нуклеиновых кислот (LNA) (также называемых в данном документе "запертыми нуклеотидами"). Согласно одному варианту осуществления запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид с модифицированным рибозным фрагментом, в котором рибозный фрагмент содержит дополнительные мостиковые соединяющие, например, 2'- и 4'-углероды. Такая структура эффективно "запирает" рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке, повышает термостабильность и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1): 439-447; Mook, OR. et al., (2007) Mol Cane Ther 6(3): 833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12): 3185-3193).

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение нуклеотидов с запертыми нуклеиновыми кислотами, включают в себя без ограничения следующие: патенты США №№ 6268490; 6670461; 6794499; 6998484; 7053207; 7084125; 7399845 и 8314227, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные LNA включают без ограничения 2', 4'-С-метиленбициклонуклеотид (см., например, Wengel et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/66604 и WO 99/14226).

Согласно другим вариантам осуществления средства на основе iRNA включают один или несколько (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) нуклеотидов с G-зажимом. Нуклеотид с G-зажимом представляет собой модифицированный аналог цитозина, где модификации придают способность связываться водородными связями как по Уотсону и Крику, так и по Хугстину, с комплементарным гуанином в дуплексе, см., например, Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc, 120, 8531-8532. Замещение одного аналога с G-зажимом в олигонуклеотиде может приводить к значительно повышенной термостабильности спирали и распознаванию ошибочно спаренных оснований при гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами. Включение таких нуклеотидов в молекулы iRNA может приводить к повышенной аффинности и специфичности к мишеням нуклеиновых кислот, комплементарным последовательностям или матричным нитям.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать в себя N[-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Hyp-NHAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (эфир), N[-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-амино), 2-докозаноил-уридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Раскрытие такой модификации можно найти в публикации PCT № WO 2011/005861.

#### Мотивы iRNA

Согласно одному варианту осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I):

5' 
$$n_p$$
- $N_a$ - $(X X X)_i$ - $N_b$ - $Y Y Y -N_b$ - $(Z Z Z)_j$ - $N_a$ - $n_q$  3' (I)

где

каждая из і и ј независимо равняется 0 или 1;

каждая из р и q независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждая  $n_p$  и  $n_q$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид; где Nb и Y имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно в YYY все нуклеотиды 2'-Fмодифицированы.

Согласно одному варианту осуществления  $N_a$  и/или  $N_b$  имеет модификации чередующегося паттерна.

Согласно одному варианту осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит участок дуплекса, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или рядом с ним (например, может находиться в положениях 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

Согласно одному варианту осуществления і равняется 1, а ј равняется 0, или і равняется 0, а ј равняется 1, или как і, так и ј равняются 1. Смысловая нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:

$$5'$$
  $n_p$ - $N_a$ - $YYY$ - $N_b$ - $ZZZ$ - $N_a$ - $n_q$   $3'$  (Ib);  $5'$   $n_p$ - $N_a$ - $XXX$ - $N_b$ - $YYY$ - $N_a$ - $n_q$   $3'$  (Ic); или  $5'$   $n_p$ - $N_a$ - $XXX$ - $N_b$ - $YYY$ - $N_b$ - $ZZZ$ - $N_a$ - $n_q$   $3'$  (Id).

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ic),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Id), каждая  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно,  $N_b$  равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждая из X, Y и Z может быть одинаковой или отличной от остальных.

Согласно другим вариантам осуществления і равняется 0, а ј равняется 0 и смысловая нить может быть представлена формулой:

5' 
$$n_p$$
- $N_a$ - $YYY$ - $N_a$ - $n_q$  3' (Ia).

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ia), каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления последовательность антисмысловой нити RNAi может быть представлена формулой (II):

$$5' n_{q'} - N_{a'} - (Z'Z'Z')_{k} - N_{b'} - Y'Y'Y' - N_{b'} - (X'X'X')_{l} - N_{a'} - n_{p'} 3'$$
 (II)

где

каждая из k и l независимо равняется 0 или 1;

каждая из р' и q' независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая  $N_b$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую

0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждая  $n_p$ ' и  $n_q$ ' независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где N<sub>b</sub>' и Y' имеют неодинаковую модификацию и

каждый из X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления  $N_a$ ' и/или  $N_b$ ' содержит модификации чередующегося паттерна.

Мотив Y'Y'Y' находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит участок дуплекса, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив Y'Y'Y' может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца. Предпочтительно мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12, 13.

Согласно одному варианту осуществления в мотиве Y'Y'Y' все нуклеотиды 2'-ОМемодифицированы.

Согласно одному варианту осуществления k равняется 1, а l равняется 0, или k равняется 0, а l равняется 1, или как k, так и l равняются 1.

Антисмысловая нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIc),  $N_b$ ' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IId), каждый  $N_b$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно  $N_b$  равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Согласно другим вариантам осуществления k равняется 0, а 1 равняется 0 и антисмысловая нить может быть представлена формулой:

$$5' n_{p'} - N_{a'} - Y'Y'Y' - N_{a'} - n_{q'} 3'$$
 (Ia).

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена как формула (IIa), каждая  $N_a$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждая из Х', Ү' и Z' может быть одинаковой или отличной от остальных.

Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо может быть модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждая X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в 9, 10 и 11 положениях нити, в тех случаях, когда участок дуплекса составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-OMe-модификацию или 2'-F-модификацию.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая нить, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует

дуплекс с антисмысловой нитью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId) соответственно.

Соответственно средства для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит 14-30 нуклеотидов, дуплекс для RNAi, представленный формулой (III):

смысловая:

антисмысловая:

$$5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$$

$$3' n_p - N_a - (X'X'X')_k - N_b - Y'Y'Y' - N_b - (Z'Z'Z')_l - N_a - n_q 5'$$

гле

каждый из і, ј, k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из р, р', q и q' независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a$  и  $N_a$  независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая  $N_b$  и  $N_b$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где

каждая  $n_p$ ',  $n_p$ ,  $n_q$ ' и  $n_q$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид и

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления і равняется 0, а ј равняется 0; или і равняется 1, а ј равняется 0; или і равняется 0, а ј равняется 1; или как і, так и ј равняются 0; или как і, так и ј равняются 1. Согласно другому варианту осуществления k равняется 0, а l равняется 0; или k равняется 1, а l равняется 0; k равняется 0, а l равняется 1; или как k, так и l равняются 1.

Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже:

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb), каждая  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1 -10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIc), каждая  $N_b$ ,  $N_b$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), каждая  $N_b$ ,  $N_b$ ' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$ ,  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждая из  $N_a$ ,  $N_a$ ',  $N_b$  и  $N_b$ ' независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

Каждая из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId) может быть одинаковой или отличной от остальных.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. Альтернативно, по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. Альтернативно, по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено в качестве формулы (IIIc) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. Альтернативно, по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

Согласно одному варианту осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y', модификации нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z', и/или модификации нуклеотида X отличается от модификации нуклеотида X'.

Согласно одному варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. Согласно другому варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации и  $n_p$ '>0, и по меньшей мере один  $n_p$ ' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. Согласно еще одному варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p$ '>0, и по меньшей мере один  $n_p$ ' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно другому варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p$ '>0 и по меньшей мере один  $n_p$ ' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIа), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p$ '>0 и по меньшей мере один  $n_p$ ' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту осуществления два средства для RNAi, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может быть нацелено на один и тот же ген или на два различных гена или каждое из средств может быть нацелено на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

#### Конъюгаты iRNA

Средства на основе iRNA, раскрытые в данном документе, могут находиться в форме конъюгатов. Конъюгат может быть прикреплен в любом подходящем положении в молекуле iRNA, например, на 3'-конце или 5'-конце смысловой или антисмысловой нити. Конъюгат необязательно прикреплен с помо-

щью линкера.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе iRNA, описанное в данном документе, связано химически с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые могут придавать функциональность, например, с влиянием на (например, с усилением) активность, распределение в клетке или захват клеткой iRNA. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестериновый фрагмент (Letsinger et al., Proc. Natl. Acid. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-F-тритилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатическая цепь, например додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett, 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-Огексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783), полиамин или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237), или октадециламин, или гексиламино-карбонил-оксихолестериновый фрагмент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937).

Согласно одному варианту осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства на основе iRNA, в которое он введен. Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной цели, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Типичные лиганды не будут принимать участия в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту) или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-Lглутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и сополимер дивинилового эфира гликолида, и малеинового ангидрида, N[-(2гидроксипропил) меакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (РЕG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, полиамин-пептидомиметик, полиамин-дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липил, катионный порфирин, соль четвертичного полиамина или α-спиральный пептил.

Лиганды также включают нацеливающие группы, например нацеливающее на определенную клетку или ткань средство, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например антитело, которое связывается с конкретным типом клетки, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А, углеводмуцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентнную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин В12, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида.

Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд представляет собой GalNAc, который содержит одну или несколько производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Дополнительное описание лигандов GalNAc представлено в разделе под названием Углеводные конъюгаты.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), кросс-линкеры (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, 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, геранилоксигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид апtеппареdia, Таt-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, РЕG (например, РЕG-40К), МРЕG, [МРЕG] 2, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), помощники транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеотиды (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu3+тетраазамакроциклы), динитрофенил,

HRР или AP.

Лигандами могут быть белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клетки, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или мультивалентную фукозу. Лигандом может быть, например, липополисахарид, активатор МАР-киназы р38 или активатор NF-кВ.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может улучшать захват средства на основе iRNA клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин A, фаллоидин, свинголид A, инданоцин или миосервин.

Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд, присоединенный к iRNA, описанной в данном документе, выполняет роль фармакокинетического модулятора (РК-модулятора). РК-модуляторы включают липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, средства, связывающие белки, РЕG, витамины и т.д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат несколько фосфотиоатных связей, связываются с белком сыворотки, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько из фосфотиоатных связей в остове, также пригодны согласно настоящему изобретению в качестве лигандов (например, РК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, белки сыворотки) также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов согласно вариантам осуществления, описанным в данном документе.

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением олигонуклеотида, который обладает реакционно-способной функциональностью, обусловленной боковой цепью, как например, полученной в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описанному ниже). Этот реакционно-способный олигонуклеотид может вступать в реакцию непосредственно с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют с любой из ряда защитных групп или лигандами со связывающим фрагментом, прикрепленным к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах согласно настоящему изобретению, можно получать удобным и обычным способом с помощью хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, в том числе, например, Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные в уровне техники. Также известно применение подобных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандами олигонуклеотидах и нуклеозидах, связанных с определенными последовательностями, несущими молекулы лигандов, по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могуть быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК, с использованием предшественников стандартных нуклеотидов и нуклеозидов, или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов с лигандами, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидные несущие лиганд структурные элементы.

При применении предшественников конъюгатов нуклеотидов, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез нуклеозидов, связанных с определенными последовательностями, как правило, является завершенным, а молекула лиганда затем вступает в реакцию со связывающим фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам осуществления олигонуклеотиды или связанные олигонуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезированы автоматическим синтезатором с применением фосфорамидатов, полученных из конъюгатов нуклеозидов с лигандами, в дополнение к стандартным фосфорамидатам и не стандартным фосфорамидатам, которые коммерчески доступны и, как правило, применяют в синтезе олигонуклеотидов.

#### Конъюгаты липидов

Согласно одному варианту осуществления лиганд представляет собой липид или липидную молекулу. Такой липид или липидная молекулу могут, как правило, связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно применять другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например,

можно применять непроксин или аспирин. Липид или липидный лиганд может (а) повышать устойчивость к разрушению коньюгата, (b) улучшать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (c) может быть применен для корректировки связывания с сывороточным белком, например HSA.

Липидный лиганд можно применять для модулирования, например, регулирования (например, ингибирования) связывания конъюгата с целевой тканью. Например, менее вероятно, что липид или липидный лиганд, который связывается с HSA более сильно, будет нацелен на почки и, таким образом, менее вероятно, что он будет выведен из организма. Липид или липидный лиганд, который связывается с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

Согласно одному варианту осуществления липидный лиганд связывается с HSA. Например, лиганд может связываться с HSA с достаточной аффинностью, таким образом, распределение конъюгата в отличной от ткани почек ткани усиливается. Однако, как правило, аффинность не является настолько сильной, что связывание HSA-лиганда не может быть необратимым.

Согласно другому варианту осуществления липидный лиганд связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что распределение конъюгата в почке будет усиливаться. Другие фрагменты, которые нацелены на клетки почек, также можно применять вместо или в дополнение к липидным лигандам.

Согласно другому аспекту лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Такие варианты являются особенно пригодными для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамин A, E и K. Другие иллюстративные витамины включают витамин B, например фолиевую кислоту, B12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или биогенные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

## Средства, обеспечивающие проникновение в клетку

Согласно другому аспекту лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, такое как спиральное средство для проникновения в клетку. Согласно одному варианту осуществления средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopedia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, при этом средство может включать пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральное средство, как правило, представляет собой α-спиральное средство и может характеризоваться липофильной и липофобной фазой.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептида или пептидомиметика к средствам на основе iRNA может влиять на фармакокинетическое распределение iRNA, например, посредством усиления распознавания клеток и абсорбции клетками. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять примерно 5-50 аминокислот в длину, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептидом или пептидомиметиком, может быть, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Туг, Тгр или Рhe). Фрагментом, представляющим собой пептид, может быть пептид-дендример, пептид с ограниченной конформационной свободой или перекрестно сшитый пептид. Согласно другому альтернативному варианту фрагмент, представляющий собой пептид, может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (МТS). Иллюстративный содержащий гидрофобную MTS пептид представляет собой RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 3367). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:3368)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Фрагмент, представляющий собой пептид, может быть пептидом "для доставки", который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, последовательности белка Tat HIV (GRKKRRQRRRPPQ SEQ ID NO:3369)) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3370)) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354: 82-84, 1991). Как правило, пептид или пептидомиметик, связанный со средством на основе dsRNA посредством введенной мономерной единицы, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Фрагмент, представляющий собой пептид, может характеризоваться длиной в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, как например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любые из структурных модификаций, описанных ниже.

RGD-пептид для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на конкретную(определенные) ткань(ткани). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Предпочтительные коньюгаты этого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно применять для нацеливания на конкретный тип клетки, например, опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). RGD-пептид может облегчать нацеливание средства на основе dsRNA на опухоли ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Как правило, RGD-пептид будет облегчать нацеливание средства на основе iRNA на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на конкретные ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство на основе iRNA к опухолевой клетке, экспрессирующей  $\alpha V \beta_3$  (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42: 326-336, 2001).

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как клетка бактерии или гриба, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, обеспечивающим проникновение в микробную клетку, например, может быть αспиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin PI), содержащий дисульфидную связь пептид (например, α-дефензин, β-дефензин или бактенецин) или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31: 2717-2724, 2003).

#### Углеводные конъюгаты

Согласно некоторым вариантам осуществления композиций и способов по настоящему изобретению олигонуклеотид iRNA дополнительно содержит углевод. Конъюгированная с углеводом iRNA является предпочтительной для in vivo доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, пригодных для in vivo терапевтического применения, описанного в данном документе. Используемое в данном документе выражение "углевод" относится к соединению, которое представляет собой углевод рег se, образованный из одного или нескольких единиц моносахаридов, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединению, имеющему в качестве его части углеводный фрагмент, образованный из одного или нескольких единиц моносахаридов, каждая из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 единиц моносахаридов) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Определенные моносахариды включают С5 и более (например, С5, С6, С7 или С8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя единицами моносахаридов (например, С5, С6, С7 или C8).

Согласно одному варианту осуществления углеводный конъюгат содержит моносахарид. Согласно одному варианту осуществления моносахаридом является N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc описаны, например, в патенте США № 8106022, все содержимое которого, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат GalNAc выполняет роль лиганда, который нацеливает iRNA к конкретным клеткам. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат GalNAc нацеливает iRNA к клеткам печени, например, выполняя роль лиганда для рецептора асиалогликопротеина в клетках печени (например, гепатоцитах).

Согласно некоторым вариантам осуществления углеводный конъюгат содержит одно или несколько производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены с помощью линкера, например, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой нити. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован со средством на основе iRNA (например, с 3'-концом смысловой нити) с помощью линкера, например, линкера, описанного в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат GalNAc представляет собой

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi присоединено к углеводному конъюгату с помощью линкера, как показано в следующей схеме, где X представляет собой О или S

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi конъюгировано с L96, как определено в табл. 1 и показано ниже

Согласно некоторым вариантам осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из

Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения

(Формула XXIII),

где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

Согласно некоторым вариантам осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, описанных выше, таких как без ограничения Ркмодулятор и/или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

Согласно одному варианту осуществления iRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с углеводом с помощью линкера. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов с iRNA с линкерами композиций и способов согласно настоящему изобретению включают без ограничения

где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

## Линкеры

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду iRNA с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Выражение "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, связывает ковалентными связями две части соединения. Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, единицу, такую как NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH или цепь из атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклиалкенил, гетероциклиалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалке-алкил. алкилгетероарилалкенил. алкилгетероарилалкинил. алкерингетероарилалкил. алкенилгетероарилалкенил, алкерилгетероалкинил, алкилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкенилилилетероарилалкенилилетероарилалкенилилетероарилалкенилилетероарилалкенилилетероарилалкенилетероарилетероарилетероарилетероарилетероарилетероарилетероарилетероарилетероарилете лалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в которых один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R8), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклилом; где R8 представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический компонент. Согласно одному варианту осуществления линкер составляет приблизительно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

Согласно одному варианту осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным и трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XXXI)-(XXXIV):

где

q2A, q2B, q3 A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B и q5C независимо представляют собой для каждого случая

0-20, и где повторяющаяся единица может быть рдинаковой или различной; каждая из  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или

 $Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчи-

ваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R"), C $\equiv$ C или C(O); каждый из R<sup>2A</sup>, R<sup>2B</sup>, R<sup>3A</sup>, R<sup>3B</sup>, R<sup>4A</sup>, R<sup>4B</sup>, R<sup>5A</sup>, R<sup>5B</sup>, R<sup>5C</sup> независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-, CO, CH=N-O,

или гетероциклил:

 $L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т.е. независимо для каждого случая моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R<sup>a</sup> представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно пригодны для применения со средствами на основе RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как из формулы (XXXV):

Формула ХХХ\

где  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой моносахарид, такой как производное GalNAc.

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают без ограничения структуры, приведенные выше в виде формул II, VII, XI, X и XIII.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при вхождении в целевую клетку расшепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. Согласно предпочтительному варианту осуществления расшепляемая линкерная группа расщепляется приблизительно в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 раз или более, или по меньшей мере приблизительно в 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом упомянутом условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделировании внутриклеточных условий), чем в крови субъекта или при втором упомянутом условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования условий, которые имеют место в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к средствам расщепления, например, рН, редокспотенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или встречаются при более высоких уровнях или при большей активности внутри клетки, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих средств включают окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для конкретных субстратов или которые не обладают специфичностью к субстратам, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать редоксрасщепляемую линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, таковые, которые приводят к рН, равному пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве универсальной кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчивой к рН. рН сыворотки человека составляет 7,4, в то время как средняя внутриклеточная рН немного ниже, и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым рН, приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, тем самым высвобождается катионный липид из лиганда внутрь клетки или в предпочтительный компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например, лиганд, нацеливаемый на печень, может быть связан с катионным липидом с помощью линкера, который включает эфирную группу. Клетки печени содержат много эстераз, и, таким образом, линкер может быть расщеплен более эффективно в клетках печени, чем в клетках, которые не содержат много эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коры почек и семенника.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять при нацеливании на другие типы клеток с высоким содержанием пептидаз, такие как клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность кандидатной расшепляемой линкерной группы может быть оценена с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) расшеплять линкерную группу. Кроме того, желательным также является тестирование кандидатной расшепляемой линкерной группы в отношении способности выдерживать расшепление в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость расшеплению между первым и вторым условием, где первое выбирают в качестве показателя расшепления в целевой клетке и второе выбирают в качестве показателя расшепления в других тканях или биологическим жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или для целых животных. Может быть полезным выполнять первоначальные измерения в условиях бесклеточной системы или в условиях культуры, а подтверждать с помощью дополнительных измерений на целых животных. Согласно предпочтительным вариантам осуществления пригодные кандидатные соединения расшепляются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в in vitro условиях, выбранных для имитации внутриклеточных условий).

# Расщепляемые с помощью редокс-потенциала линкерные группы

Согласно одному варианту осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую с помощью редокс-потенциала линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с определенным фрагментом iRNA и определенным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидат может быть оценен при помощи инкубирования с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реактивов, известных в уровне техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, целевой клетке. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке. Согласно одному варианту кандидатные соединения расщепляются в наибольшей степени приблизительно на 10% в крови. Согласно другим вариантам осуществления пригодные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в in vitro условиях, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в in vitro условиях, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений может быть определена при помощи стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточных сред, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточных сред.

# Фосфатные расщепляемые линкерные группы

Согласно другому варианту осуществления расщепляемый линкер содержит фосфатную расщепляемую линкерную группу. Фосфатная расщепляемая линкерная группа расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. Примерами фосфатных линкерных групп являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S

P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными вариантами осуществления являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-O-, -S-P(O)(OH)-S-. Предпочтительным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

#### Расщепляемые кислотами линкерные группы

Согласно другому варианту осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется при кислых условиях. Согласно предпочтительным вариантам осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с рН приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут выступать в роли универсальной кислоты. В клетке определенные органеллы с низким рН, такие как эндосомы и лизосомы, обеспечивают среду расщепления для расщепляемых кислотами линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотами линкерных групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотами группы могут характеризоваться общей формулой -C=NN-, C(O)O или -OC(O). Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда углерод, присоединяемый к кислороду сложного эфира (алкоксигруппе), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или четвертичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

#### Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы

Согласно другому варианту осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную расщепляемую линкерную группу. Сложноэфирная расщепляемая линкерная группа расщепляется ферментами, такими как клеточные эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

# Пептидные расщепляемые линкерные группы

Согласно еще одному варианту осуществления расщепляемый линкер содержит пептидную расщепляемую линкерную группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется ферментами, такими как клеточные пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может образовываться между любым алкиленом, алкениленом или алкинеленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами с получением пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образованной между аминокислотами, с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой - NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение конъюгатов РНК, включают без ограничения патенты США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730;5552538; 5578717, 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603;5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241, 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585,481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; 8106022, полное содержание каждого из которых включено в данный документ при помощи ссылки.

Нет необходимости, чтобы все положения в данном соединении были единообразно модифицированными, и, фактически, более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в iRNA. Настоящее изобретение также предусматривает соединения iRNA, которые являются химерными соединениями.

"Химерные" соединения iRNA, или "химеры", в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения iRNA, например, dsRNA, которые содержат две или более химически разных участка, при этом каждый состоит по меньшей мере из одной мономерной единицы, т.е. нуклеотида, в случае соединения dsRNA. Такие iRNA, как правило, содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицируют так, чтобы придать iRNA повышенную устойчивость к разрушению нуклеазой, улучшенный захват клеткой и/или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гиб-

риды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКаза Н является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет нить РНК дуплекса РНК ДНК Активация РНКазы Н, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК со значительным повышением, таким образом, эффективности ингибирования экспрессии гена посредством iRNA. Следовательно, при применении химерных dsRNA сравниваемые результаты часто могут быть получены для более коротких iRNA по сравнению с фосфотиоатдезокси dsR-NA, гибридизирующимися с тем же целевым участком. Расщепление целевой РНК, как правило, можно выявить путем гель-электрофореза и при необходимости с помощью ассоциированных с гибридизацией нуклеиновых кислот методик, известных в уровне техники.

В некоторых случаях РНК из iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с iRNA для усиления активности, распределения в клетке или клеточного захвата iRNA, и процедуры для выполнения таких типов конъюгирования доступны в научной литературе. В такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включены липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comrn., 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-F-тритилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al, Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49), фосфолипид, например ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-Огексадецил-рац-глицеро-3-H-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al, Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777), полиамин или полиэтиленгликольная цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969) или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229), или октадециламин, или гексиламино-карбонил-оксихолестериновый фрагмент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Then, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты Соединенных Штатов, которые описывают получение таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные протоколы конъюгирования предусматривают синтез РНК, несущих аминолинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем проводят реакцию аминогруппы с молекулой, подлежащей конъюгированию, при помощи соответствующих реагентов конденсации или активации. Реакция конъюгирования может быть выполнена либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, дает чистый конъюгат.

## Доставка iRNA

Доставка iRNA нуждающемуся в этом субъекту может быть осуществлена несколькими различными путями. Доставку in vivo можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например dsRNA. Альтернативно, доставку можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию iRNA. Такие альтернативные случаи описаны далее ниже.

### Прямая доставка

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты может быть адаптирован для применения с iRNA (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5): 139-144 и WO 94/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в своей полноте). Однако, существуют три фактора, которые необходимо учитывать для успешной доставки молекулы iRNA in vivo: (a) биологическая стабильность доставляемой молекулы, (2) предупреждение неспецифических эффектов, и (3) накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например, путем прямой инъекции, или вживления в ткань (в качестве неограничивающего примера опухоли), или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы iRNA. В нескольких исследованиях был показан эффективный нокдаун генных продуктов при введении iRNA локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, MJ., et al. (2004) Retina 24: 132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al (2003) Mol. Vis. 9: 210-216) предупреждают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной дегенерации макулы. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам снижает объем опухолей (Pille, J., et al. (2005) Mol. Ther. 11: 267-274) и может увеличивать выживаемость мышей с опухолями (Kim, WJ., et al. (2006) Mol. Ther. 14: 343-350; Li, S., et al. (2007) Mol. Ther. 15: 515-523). РНК-интерференция также была успешной при локальной доставке к CNS путем прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) J. Neurophysiol. 93: 594-602) и к легким путем интраназального введения (Howard, KA., et al. (2006) Mol. Ther. 14: 476-484; Zhang, X., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al. (2005) Nat. Med. 11:50-55). Что касается системного введения iRNA для лечения заболевания, PHK может быть модифицирована или, альтернативно, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа служат для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами in vivo.

Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут обеспечивать нацеливание композиции на основе iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать при помощи химической коньюгации с другими группами, например, липидной или углеводной группой, описанными в данном документе. Такие коньюгаты можно применять для нацеливания iRNA на определенные клетки, например, клетки печени, например, гепатоциты. Например, коньюгаты GalNAc или составы на основе липидов (например, LNP) можно применять для нацеливания iRNA на определенные клетки, например, клетки печени, например, гепатоциты.

Липофильные группы, такие как холестерин, улучшают захват клеткой и предупреждают разрушение. Например, направленную против ApoB iRNA, конъюгированную с фрагментом, представляющим собой липофильный холестерин, инъецировали системно мышам, что приводило к нокдауну mRNA ароВ как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al. (2004) Nature 432:173-178). Как было показано, конъюгация iRNA с аптамером способствует ингибированию роста опухоли и опосредует регресс опухоли на мышиных моделях рака предстательной железы (McNamara, JO., et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24: 1005-1015). Согласно альтернативному варианту осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной) и также увеличивают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного захвата iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо быть связанными с iRNA, либо их индуцируют с целью образования везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH., et al. (2008) Journal of Controlled Release 129(2): 107-116), которые заключают в себя iRNA. Образование везикул или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при введении системно. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалиста в данной области (см., например, Sorensen, DR., et al. (2003) J. Mol. Biol 327: 761-766; Verma, UN., et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9: 1291-1300; Arnold, AS et al. (2007) J. Hypertens. 25:197-205, которые включены в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al. (2003), выше; Verma, UN., et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS., et al (2006) Nature 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A., et al (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME., et al (2008) Pharm. Res. электронная публикация перед печатью 16 августа; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487) и полиамидоамины (Tomalia, DA., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804). Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA образуют комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции на основе iRNA и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте.

# Кодируемые векторами iRNA

Согласно другому аспекту iRNA, нацеленная на ген ALAS1, может экспрессироваться из транскрипционных единиц, вставленных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевой ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также может быть сконструирован с возможностью наследования его в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 1292).

Отдельные нить или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В тех случаях, когда необходимо экспрессировать две отдельные нити с получением, например, dsRNA, тогда в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфекции). Альтернативно, каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. Согласно одному варианту осуществления dsRNA экспрессируется в инвертированном повторе, соединенном линкерной полинуклеотидной последовательностью, таким образом, что dsRNA имеет структуру типа "стебельпетля"

Вектор экспрессии с iRNA, как правило, является ДНК-плазмидой или вирусным вектором. Вектор экспрессии, совместимый с эукариотическими клетками, например, с клетками позвоночных, можно

применять для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, как описано в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в уровне техники и доступны от ряда коммерческих источников. Как правило, такие векторы содержат удобные сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные от пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в необходимую целевую клетку.

Плазмиду экспрессии iRNA можно трансфицировать в целевую клетку в виде комплекса с носителем на основе катионного липида (например, олигофектамином) или носителем на основе некатионных липидов (например, Transit-TKO<sup>TM</sup>). В настоящем изобретением также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для iRNA-опосредованного нокдауна, нацеленного на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки хозяина можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, о временной трансфекции может сообщать репортер, такой как флуоресцентный маркер, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток ех vivo может быть подтверждена с применением маркеров, которые обеспечивают устойчивость трансфицированной клетки к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), как например, устойчивость к гигромицину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать для способов и композиций, описанных в данном документе, включают, без ограничения, (а) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышиного лейкоза Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины или авипокс, например, канарипокс или вируса оспы кур и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы с нарушенной репликацией. Различные векторы будут или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. Альтернативно, конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии iRNA, как правило, будут необходимы регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д. для обеспечения экспрессии iRNA в целевых клетках. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, описаны далее ниже.

Векторы, пригодные для доставки iRNA, будут включать регуляторные элементы (промотор, энхансер и т.д.), достаточные для экспрессии iRNA в необходимой целевой клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессия iRNA может быть точно регулируемой, например, путем применения индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8: 20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование при помощи экдизона, при помощи эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-P-D1-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена iRNA.

Согласно конкретному варианту осуществления можно применять вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA. Например, можно применять ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)). Такие ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты в организм пациента. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена mdr1 к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам лучшей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); и Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для применения при доставке iRNA. Аденовирусы пред-

ставляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов к респираторному эпителию. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими целями для основанных на аденовирусах системах доставки являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Аденовирусы обладают преимуществом в том смысле, что они способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. В Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) показано применение аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макак-резус. Другие примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993); публикации согласно РСТ WO94/12649 и Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Подходящий AV вектор для экспрессии iRNA, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

Также предусмотрено применение векторов на основе адено-ассоциированного вируса (AAV) (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Sci., USA 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). Согласно одному варианту осуществления iRNA может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных однонитевых молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AV вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помоши ссылки.

Другой типичный вирусный вектор представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипокс, как, например, вирус оспы кур или канарипокс.

Тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замещения различных вирусных капсидных белков, в случае необходимости. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т.п. AAV-векторы можно получать для нацеливания на различные клетки путем конструирования векторов так, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76: 791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ при помощи ссылки.

Фармацевтический препарат вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки генов. Альтернативно, в случае, когда вектор доставки целого гена может вырабатываться нативно рекомбинантными клетками, например, ретровирусные векторы, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые предусматривают систему доставки генов.

# III. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение представляет фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, содержащая iRNA, является применимой для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью гена ALAS1 (например, нарушения, включающего порфириновый путь). Такие фармацевтические композиции составляют, исходя из способа доставки. Например, композиции могут быть составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем внутривенной (IV) доставки. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию, представленную в данном документе (например, состав LNP), составляют для внутривенной доставки. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию, представленную в данном документе (например, композицию, содержащую конъюгат GalNAc), составляют для подкожной доставки.

Фармацевтические композици, описанные в данном документе, вводят в дозе, достаточной для ингибирования экспрессии гена ALAS1. Как правило, подходящая доза iRNA будет находиться в диапазоне от 0,01 до 200,0 миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в сутки, как правило, в диапазоне от 1 до 50 мг на килограмм массы тела в сутки. Например, dsRNA можно вводить по 0,05, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 10, 20, 30, 40 или 50 мг/кг на разовую дозу. Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в сутки или iRNA можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня или даже с применением непрерывной инфузии, или доставки с помощью состава с контролируемым высвобождением. В таком случае количество iRNA, содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить общую суточную дозу. Единица дозирования

также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, с применением традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение iRNA в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны из уровня техники и особенно пригодны для доставки средств в определенный участок, например, их можно применять со средствами по настоящему изобретению. Согласно такому варианту осуществления единица дозирования содержит соответствующее количество суточной дозы.

Эффект разовой дозы в отношении уровней ALAS1 может быть длительным, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, варианты предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один период лечения или серию периодов лечения. Расчеты эффективных доз и времени полужизни in vivo для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методологий, или на основании тестирования in vivo с применением соответствующей животной модели, как описано в другой части в данном документе.

Достижения в области генетики мыши привели к созданию ряда мышиных моделей для исследования различных заболеваний человека, таких как патологические процессы, связанные с экспрессией ALAS1 (например, патологические процессы, включающие порфирины или нарушения в рамках порфиринового пути, такие как, например, порфирии). Такие модели можно применять для in vivo тестирования iRNA, а также для определения терапевтически эффективной дозы и/или эффективной схемы дозирования.

Подходящей мышиной моделью, например, является мышь, содержащая трансген, экспрессирующий ALAS1 человека. Мыши с мутациями нокин (например, мутациями, которые ассоциированы с острыми печеночными порфириями у людей) можно применять для определения терапевтически эффективной дозы и/или длительности введения siRNA ALAS1. Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают соединения iRNA, описанные в настоящем изобретении. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или же системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (например, при помощи трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или вдувания порошков или аэрозолей, в том числе при помощи ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например посредством вживленного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, интратекальное или интравентрикулярное введение.

iRNA можно доставлять таким образом, чтобы происходило нацеливание на конкретную ткань, такую как, ткань, которая вырабатывает эритроциты. Например, iRNA может быть доставлена в костный мозг, печень (например, гепатоциты печени), лимфатические узлы, селезенку, легкие (например, плевру легких) или позвоночник. Согласно одному варианту осуществления iRNA доставляется в костный мозг.

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными могут быть общепринятые фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.д. Также можно использовать презервативы с покрытием, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают составы, в которых iRNA, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоил фосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеоил фосфатидилэтаноламин (DOT-MA)). iRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. Альтернативно, iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или  $C_{1,20}$ алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмиристат (LPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

#### Липосомные составы

Существует много упорядоченных поверхностно-активных структур, помимо микроэмульсий, которые были исследованы и которые применяют для состава лекарственных средств. Они включают монослои, мицеллы, бислои и везикулы. Везикулы, такие как липосомы, привлекли к себе большой интерес в связи со своей специфичностью и длительностью действия, которую они обеспечивают с точки зрения доставки лекарственных средств. Используемое в настоящем изобретении выражение "липосома" означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, упорядоченных в сферический бислой или бислои.

Липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водное внутреннее пространство. Водная часть содержит композицию, подлежащую доставке. Катионные липосомы обладают преимуществом в том смысле, что они способны сливаться с клеточной стенкой. Некатионные липосомы, хотя и не могут сливаться настолько эффективно с клеточной стенкой, поглощаются макрофагами in vivo.

Для того, чтобы пройти через интактную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны пройти через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Таким образом, желательно применять липосому с высокой способностью к деформации и способностью проходить через такие мелкие поры.

Дополнительные преимущества липосом включают: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, биосовместимы и биоразрушаемы; липосомы могут включать широкий диапазон воды и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные лекарственные средства во внутренних отделениях от метаболизма и разрушения (Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, р. 245). Важными аспектами в получении липосомных составов являются заряд поверхности липида, размер пузырька и водный объем липосом.

Липосомы являются пригодными для переноса и доставки активных ингредиентов к участку действия. Поскольку мембрана липосом структурно подобна биологическим мембранам, при нанесении липосом на ткань, липосомы начинают сливаться с клеточными мембранами и по мере продолжения слияния липосомы и клетки, содержимое липосом выбрасывается в клетку, где может действовать активное средство.

Липосомные составы были предметом обширного исследования в качестве способа доставки многих лекарственных средств. Существует все больше данных о том, что в случае местного применения липосомы проявляют некоторые преимущества по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие, связанное с высокой степенью системной абсорбции введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в необходимой цели и возможность вводить в кожу широкий спектр лекарственных средств, как гидрофильных, так и гидрофобных.

В нескольких отчетах подробна описана способность липосом доставлять в кожу средства, в том числе ДНК с высоким молекулярным весом. В кожу вводили соединения, в том числе анальгетики, антитела, гормоны и ДНК с высоким молекулярным весом. Результатом большей части было нацеливание в верхний слой эпидермиса.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы являются положительно заряженными липосомами, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами ДНК с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс ДНК/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие того, что внутри эндосомы кислый рН, липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно-заряженными, захватывают ДНК вместо образования комплекса с ними. Поскольку как ДНК, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть ДНК захватывается водным внутренним пространством этих липосом. pH-чувствительные липосомы применяли для доставки ДНК, кодирующей ген тимидинкиназы, к монослоям клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена выявляли в целевых клетках (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Один основной тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Композиции нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции анионных липосом, как правило, образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы главным образом из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

В некоторые исследованиях оценивали местную доставку липосомных лекарственных составов в кожу. Нанесение липосом, содержащих интерферон, на кожу морских свинок, приводило к уменьшению герпетических поражений кожи, в то время как доставка интерферона другими способами (например, в

виде раствора или эмульсии) была неэффективной (Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410). Также в дополнительном исследовании тестировали эффективность интерферона, вводимого в виде части липосомного состава, по сравнению с введением интерферона с применением водной системы, и сделали заключение, что липосомный состав был более эффективным по сравнению с водным введением (du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265).

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome<sup>тм</sup> I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome<sup>тм</sup> II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), применяли для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в облегчении депонирования циклоспорина-А в различных слоях кожи (Hu et al. S.T.P.Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, выражение, используемое в данном документе, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в крови по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть липидной составляющей, образующей везикулу липосомы (А), содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G<sub>м1</sub>, или (В), полученная из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (РЕG) фрагмент. Без углубления в теорию, в уровне техники полагают, что по меньшей мере для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или РЕG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженной степени захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al, Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Разнообразные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны из уровня техники. Рараһаdjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозида  $G_{\rm M1}$ , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти результаты были интерпретированы Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патентах США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen et al., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид  $G_{\rm M1}$  или сложные эфиры сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al.).

В уровне техники известно много липосом, содержащих липиды, полученные с помощью одного или нескольких гидрофильных полимеров, и способы их получения. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) описали липосомы, содержащие неионный детергент, 2C<sub>1215G</sub> который содержит РЕG-фрагмент. Ilium et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) обнаружили, что гидрофильное покрытие полистиреновых частиц полимерными гликолями приводит к значительно увеличенному времени полужизни в крови. Синтетические фосфолипиды, модифицированные присоединением карбоновых групп полиалкиленгликолей (например, PEG), описаны Sears (патенты США №№ 4426330 и 4534899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) описали эксперименты, демонстрирующие, что липосомы, содержащие фосфатидилэтаноламин (РЕ), полученный с помощью РЕС или РЕС стеарата, характеризуются значительным увеличением времени полужизни в крови. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) расширили такие наблюдения в отношении других дериватизированных РЕG фосфолипидов, например, DSPE-PEG, образованный в результате комбинации дистеароилфосфатидилэтаноламина (DSPE) и PEG. Липосомы, содержащие ковалентно связанные PEG-фрагменты на своей внешней поверхности, описаны в европейском патенте № EP 0445131 B1 и WO 90/04384 Fisher. Липосомные композиции, содержащие 1-20 мольных процентов PE, дериватизированных PEG, и способы их получения описаны Woodle et al. (патенты США №№ 5013556 и 5356633) и Martin et al. (патент США № 5213804 и европейский патент № ЕР 0496813 В1). Липосомы, содержащие ряд других конъюгатов липид-полимер раскрыты в WO 91/05545 и патенте США № 5225212 (оба из которых принадлежат Martin et al.) и в WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Липосомы, содержащие PEG-модифицированный церамид, раскрыты в WO 96/10391 (Choi et al). В патенте США № 5540935 (Mivazaki et al) и патенте США № 5556948 (Тадаwa et al.) описаны РЕGсодержащие липосомы, которые могут быть дополнительно дериватизированы функциональными фрагментами на их поверхностях.

В уровне техники известен ряд липосом, содержащих нуклеиновые кислоты. В WO 96/40062 Thierry et al. раскрываты способы инкапсулирования в липосомы нуклеиновых кислот с высоким молекулярным весом. В патенте США № 5264221 Tagawa et al. раскрыты связанные с белком липосомы и заявлено, что содержимое таких липосом может включать dsRNA. В патенте США № 5665710 Rahman et al. описаны определенные способы инкапсулирования в липосомы олигодезоксинуклеотидов. В WO 97/04787 Love et

al. раскрыты липосомы, содержащие dsRNA, нацеленные на ген raf.

Трансферсомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью деформироваться, они являются перспективными кандидатами как средства доставки лекарственных средств. Трансферсомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капелька. Трансферсомы являются приспосабливающимися к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор кожи), самовосстанавливающимися, зачастую достигают мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферсом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы применяли для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, является применение гидролипидного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, р. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионное поверхностно-активное вещество. Неионные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их можно применять при широком диапазоне значений рН. Обычно их значения НLВ находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18, в зависимости от их структуры. Неионные поверхностно-активные вещества включают неионные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерила, сложные эфиры полиглицерила, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионные алканоамиды и эфиры, как, например, этоксилаты жирного спирта, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блоксополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как, например, омыляющие вещества, ациллактилаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают четвертичные соли аммония и этоксилированные амины. Четвертичные соли аммония являются наиболее применяемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести либо положительный, либо отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламиды, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

# Частицы нуклеиновая кислота-липид

Согласно одному варианту осуществления dsRNA ALAS1, описанная в настоящем изобретении, полностью инкапсулирована в липидный состав, например, с образованием SPLP, pSPLP, SNALP или другой частицы нуклеиновая кислота-липид. Используемое в данном документе выражение "SNALP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид, в том числе SPLP. Используемое в данном документе выражение "SPLP" относится к частице нуклеиновая кислота-липид, содержащей плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидной везикуле. SNALP и SPLP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат РЕСлипид). SNALP и SPLP особенно пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в крови после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). SPLP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который приведен в публикации согласно РСТ № WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению

обычно имеют средний диаметр от приблизительно 50 до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 до приблизительно 90 нм и практически нетоксичны. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации согласно РСТ № WO 96/40964.

Согласно одному варианту осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение масса/масса) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находится в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(I-(2,3-диолеоил-(DOTAP), окси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид N-(I-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,Nтриметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлористую соль 1,2дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеоил-3триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) (DLinAP), 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилоксо-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12диенил)тетрагидро-3аН-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат(MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Согласно другому варианту осуществления можно применять соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан для получения наночастиц липид -siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолана описан в предварительной заявке на патент США № 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки.

Согласно одному варианту осуществления частицы липид-siRNA включают 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан; 10%DSPC; 40% холестерин; 10% PEG-C-DOMG (мольный процент) с размером частиц  $63.0 \pm 20$  нм и соотношением siRNA/липид 0,027.

Некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе без ограничения дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), ди-пальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилхолин (DOPC), диолеоил-фосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоил-фосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароил-фосфатидил-этаноламин (DSPE), 16-О-монометил-РЕ, 16-О-диметил-РЕ, 18-1-транс-РЕ, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 90 мол. %, приблизительно 10 или приблизительно 58 мол.%, если холестерин включен, от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEO)-липид, в том числе, без ограничения, PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил (C1г), PEG-димиристоилоксипропил (Ci<sub>4</sub>), PEG-дипальмитилоксипропил (Ci<sub>6</sub>) или PEG-дистеарилоксипропил (Ci<sub>8</sub>). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 до приблизительно 20 мол.% или приблизительно 2 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице

Согласно некоторым вариантам осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид дополнительно включают холестерин в количестве, например, от приблизительно 10 до приблизительно 60 мол.% или приблизительно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составлена в виде липидной наночастицы

(LNP).

#### LNP01

Согласно одному варианту осуществления липидоид ND98·4HC1 (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно применять для получения наночастицы липид-dsRNA (т. е. частиц LNP01). Маточные растворы каждого в этаноле могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, РЕG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например, в мольрном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы липид-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру, полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечением по размеру в 100 нм) с применением, например, экструдера с термоцилиндром, как, например, Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, при помощи диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например, забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) с рН приблизительно 7, например, рН приблизительно 6,9, рН приблизительно 7,0, рН приблизительно 7,1, рН приблизительно 7,2, рН приблизительно 7,3 или рН приблизительно 7,4.

Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая включена, таким образом, при помощи ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы с липидом-dsRNA представлены в следующей таблице.

Таблица 10. Иллюстративные липидные составы

	Катионный липид	Катионный липид/некатионный
		липид/холестерин/конъюгат PEG-
		липид
		Соотношение липид:siRNA
SNALP	-	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-
	1,2-дилиноленилокси-N,N-	cDMA
	диметиламинопропан (DLinDMA)	(57,1/7,1/34,4/1,4)
		липид:siRNA ~ 7:1
S-XTC	2,2-дилинолеил-4-	XTC/DPPC/холестерин/PEG-cDMA
	диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан	57,1/7,1/34,4/1,4
	(XTC)	липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дилинолеил-4-	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG
	диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан	57,5/7,5/31,5/3,5
	(XTC)	липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-дилинолеил-4-	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG
	диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан	57,5/7,5/31,5/3,5
	(XTC)	липид:siRNA ~ 11:1

	2,2-дилинолеил-4-	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG
LNP07	диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан	60/7,5/31/1,5,
	(XTC)	липид:siRNA ~ 6:1
	2,2-дилинолеил-4-	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG
LNP08	диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан	60/7,5/31/1,5,
	(XTC)	липид:siRNA ~ 11:1
	2,2-дилинолеил-4-	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG
LNP09	диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан	50/10/38,5/1,5
	(XTC)	липид:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2- ди((9Z,12Z)-октадека-9,12- диенил)тетрагидро-3aH-	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5
	циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	липид;siRNA 10:1
	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG
LNP11	6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-	50/10/38,5/1,5
	(диметиламино)бутаноат (МС3)	липид:siRNA 10:1
	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-	
	гидроксидодецил)амино)этил)(2-	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DMG
LNP12	гидроксидодецил)амино)этил)пипера	50/10/38,5/1,5
	зин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-	липид:siRNA 10:1
	2-ол (С12-200)	VECTORION (PPG PAG
I NID12	XTC	XTC/DSPC/xon/PEG-DMG
LNP13	XIC	50/10/38,5/1,5
		липид;siRNA; 33;1. MC3/DSPC/хол/PEG-DMG
LNP14	MC3	40/15/40/5
Livi 14	HC3	липид:siRNA: 11:1.
		MC3/DSPC/хол/PEG-DSG/GalNAc-
		PEG-DSG
LNP15	MC3	50/10/35/4,5/0,5
		липид:siRNA: 11:1.
		MC3/DSPC/хол/PEG-DMG
LNP16	MC3	50/10/38,5/1,5
LIVI 10		липид:siRNA: 7:1.
		MC3/DSPC/хол/PEG-DSG
LNP17	MC3	50/10/38,5/1,5
		липид:siRNA: 10:1.
		MC3/DSPC/хол/PEG-DMG
LNP18	MC3	50/10/38,5/1,5
		липид:siRNA: 12:1.
		MC3/DSPC/хол/PEG-DMG
LNP19	MC3	50/10/35/5
		липид:siRNA: 8:1.
		MC3/DSPC/хол/PEG-DPG
LNP20	MC3	50/10/38,5/1,5
		липид:siRNA: 10:1.
		C12-200/DSPC/хол/PEG-DSG
LNP21	C12-200	50/10/38,5/1,5
		липид:siRNA: 7:1.
		XTC/DSPC/хол/PEG-DSG
1	İ	1
LNP22	XTC	50/10/38,5/1,5

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (С 14-PEG или PEG-C14) (PEG со ср. мол.весом 2000);

PEG-DSG: РЕG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со ср. мол.весом 2000).

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая включена, таким образом, при помощи ссылки.

ХТС-содержащие составы описаны, например, в предварительной заявке США с серийным № 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № , поданной 10 июня 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/239686, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке № РСТ/US 2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

МСЗ-содержащие составы описаны, например, в предварительной заявке США с серийным № 61/244834, поданной 22 сентября 2009 г., предварительной заявке США с серийным № 61/185800, поданной 10 июня 2009 г., и международной заявке № PCT/US 10/28224, поданной 10 июня 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

ALNY-100-содержащие составы описаны, например, в международной заявке на патент с номером PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

С12-200-содержащие составы описаны в предварительной заявке США с серийным № 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и международной заявке № PCT/US 10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

#### Синтез катионных липилов

Любое из соединений, например, катионные липиды и т.п., применяемые в частицах нуклеиновая кислота-липид, описанные в настоящем изобретении, можно получить при помощи известных методик органического синтеза, включая способы, описанные более подробно в примерах. Все заместители являются такими, как определено ниже, если не указано иное.

"Алкил" означает углеводород с прямой цепью или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Типичные насыщенные алкилы с прямой цепью включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п.; тогда как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Типичные насыщенные циклические алкилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; тогда как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил и т.п.

"Алкенил" означает алкил, который определен выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Типичные алкенилы с прямой цепью и разветвленные алкенилы включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.

"Алкинил" означает любой алкил или алкенил, которые определены выше, которые дополнительно содержат по меньшей мере одну тройную связь между соседними атомами углерода. Типичные алкинилы с прямой цепью и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-метил-1-бутинил и т.п.

"Ацил" означает любой алкил, алкенил или алкинил, в которых атом углерода в точке присоединения замещен оксогруппой, которая определена ниже. Например, -C(=O)алкил, -C(=O)алкинил представляют собой ацильные группы.

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является либо насыщенным, ненасыщенным, либо ароматическим, и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизирован, в том числе бициклические кольца, в которых любой из вышеперечисленных гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, которые определены ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, гидантоинил, валеролактамил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетраги

Выражения "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксозаместителя (=O) замещаются два атома водорода. В этом отношении заместители включают оксо, галоген, гетероцикл, -CN, -OR $^x$ , -NR $^x$ R $^y$ , -NR $^x$ C(=O)R $^y$  -NR $^x$ SO $_2$ R $^y$ , -C(=O)R $^x$ , -C(=O)OR $^x$ , -C(=O)NR $^x$ R $^y$ , -SO $_n$ R $^x$  и -SO $_n$ NR $^x$ R $^y$ , где п равняется 0, 1 или 2, R $^x$  и R $^y$  являются одинаковыми или отличаются и независимо являются водородом, алкилом или гетероциклом, и каждый из упомянутых алкильных или гетероциклических заместителей может быть дополнительно замещен одним или несколькими из оксо, галогена, -OH, -CN, алкила, -OR $^x$ , гетероцикла, -NR $^x$ R $^y$ , -NR $^x$ C(=O)R $^y$  -NR $^x$ SO $_2$ R $^y$ , -C(=O)R $^x$ ,

 $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$  и  $-SO_nNR^xR^y$ .

"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы, описанные в настоящем изобретении, могут потребовать применение защитных групп. Методика с применением защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную химическую активность функциональной группы. Защитную группу можно добавлять к функциональной группе для блокирования ее химической активности во время определенных реакций и затем удалять с открытием исходной функциональной группы. Согласно некоторым вариантам осуществления применяют "защитную группу для спиртовой группы". "Защитная группа для спиртовой группы" представляет собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную химическую активность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять при помощи методик, хорошо известных в уровне техники.

#### Синтез формулы А

Согласно одному варианту осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид, описанные в настоящем изобретении, составляют с применением катионного липида формулы А:

где  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой низший алкил, или  $R_3$  и  $R_4$  могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. Согласно некоторым вариантам осуществления катионный липид представляет собой XTC, (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан). Как правило, липид формулы A, приведенной выше, может быть получен при помощи следующих схем реакций 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

Липид A, где  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой низший алкил или  $R_3$  и  $R_4$  могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, может быть получен согласно схеме 1. Кетон 1 и бромид 2 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кеталя 3 амином 4 дает липиды формулы A. Липиды формулы A можно превращать в соответствующую аммонийную соль при помощи органической соли формулы 5, где X представляет собой анион, противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или т.п.

BrMg
$$-R_1$$
 +  $R_2$ -CN  $\xrightarrow{H^*}$  0  $\stackrel{R_2}{\longrightarrow}$   $R_1$ 

Альтернативно, исходный материал в виде кетона 1 может быть получен согласно схеме 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие ли-

пиды формулы А является таким, как описано на схеме 1.

### Синтез МС3

Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата) было следующим. Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N,N-диметиламиномасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной хлористоводородной кислотой, за которой следовал разбавленный водный бикарбонат натрия. Органические фракции высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли при помощи роторного вакуумного испарителя. Остаток пропускали через колонку с силикагелем (20 г) с применением градиента элюирования 1-5% метанол/дихлорметан. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и растворитель удаляли с получением бесцветного масла (0,54 г).

### Синтез ALNY-100

Синтез кеталя 519 [ALNY-100] осуществляли с применением следующей схемы 3:

#### Синтез 515:

К перемешиваемой суспензии LiAlH4 (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного ТНГ в двугорлой RBF (1л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл ТНГ при 0°С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции отслеживали при помощи ТLС. После завершения реакции (определяли при помощи ТLС) смесь охлаждали до 0°С и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали ТНГ. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали, и разбавляли 400 мл диоксана и 26 мл конц. НСl, и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г

 $^{1}$ Н-ЯМР (DMSO, 400 МГц):  $\delta$ = 9,34 (широкий, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Синтез 516:

К перемешиваемому раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двухгорлой RBF добавляли NEt3 (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до  $0^{\circ}$ С в атмосфере азота. После медленного добавления N[-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимида (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч., определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно раствором 1 н. HCl ( $1 \times 100$  мл) и насыщенным раствором NaHCO3 ( $1 \times 50$  мл). Органический слой затем высушивали над безводн. Na2SO4 и растворитель выпаривали с получением неочищенного материала, который очищали при помощи колоночной хроматографии с силикагелем с получением 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDC13, 400 МГц):  $\delta$  = 7,36-7,27(m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (br., 1H) 2,74 (s, 3H), 2,60(m, 2H), 2,30-2,25(m, 2H). LC-MS [M+H] -232,3 (96,94%).

Синтез 517А и 517В:

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одногорлой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO4 (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции ( $\sim$ 3 ч) смесь гасили при помощи добавления твердого Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO3 (1  $\times$  50 мл), вода (1 $\times$ 30 мл) и в конце соляной раствор (1 $\times$ 50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель удаляли в вакууме. В результате очистки неочищенного материала при помощи колоночной хроматографии с силикагелем получали смесь диастереоизомеров, которые разделяли при помощи преп. HPLC. Выход: - 6 г неочищенного продукта.

517А - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%).

 $^{1}$ Н-ЯМР (DMSO, 400 МГц):  $\delta$ =7,39-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,72-1,67 (m, 4H). LC-MS - [M+H]-266,3, [M+NH4 $^{+}$ ]-283,5 присутствует, HPLC-97,86%. Стереохимию подтверждали при помощи рентгенограммы.

Синтез 518:

При помощи процедуры, аналогичной описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла.

 $^{1}$ H-ЯМР (CDC13, 400 МГц): δ=7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m,8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (br m, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65%.

Общая процедура для синтеза соединения 519:

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к охлажденному на льду раствору LAH в THF (1 M, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при  $40^{\circ}$ С в течение 0,5 ч, затем охлаждали снова на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизовали насыщенным водным  $Na_2SO_4$ , затем фильтровали через целит и переводили в масло. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла.

 $^{13}$ С ЯМР = 130,2, 130,1 (×2), 127,9 (×3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (×2), 29,7, 29,6 (×2), 29,5 (×3), 29,3 (×2), 27,2 (×3), 25,6, 24,5, 23,3, 226, 14,1; МS с электрораспылением (+ve): Молекулярный вес для  $C_{44}H_{80}NO_2$  (M + H)+ вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

Составы, полученные либо при помощи стандартного способа, либо при помощи способа без экструзии, можно характеризовать одинаковым образом. Например, составы, как правило, характеризуют при помощи визуального осмотра. Это должны быть белесые прозрачные растворы, в которых нет агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц по размеру липидных наночастиц можно измерять при помощи рассеяния света, с применением, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, CIIIa). Размеры частиц должны составлять приблизительно 20-300 нм, например 40-100 нм. Распределение частиц по размеру должно быть одновершинным. Общую концентрацию dsRNA в составе, а также захваченную фракцию определяют при помощи анализа на исключение красителя. Образец составленной dsRNA можно инкубировать со связывающимся с РНК красителем, например Ribogreen (Molecular Probes), в присутствии или в отсутствие разрушающего состав поверхностно-активного вещества, например, 0,5% Triton-XIOO. Общую dsRNA в составе можно определять по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, по отношению к калибовочной кривой. Захваченную фракцию определяют путем вычитания содержания "свободной" dsRNA (которое измерено по сигналу при отсутствии поверхностно-активного вещества) из общего содержания dsRNA. Процент захваченной dsRNA, как правило, составляет >85%. Для состава SNALP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от приблизительно по меньшей мере 50 до приблизительно по меньшей мере 110 нм, от приблизительно по меньшей мере 60 до приблизительно по меньшей мере 100 нм или от приблизительно по меньшей мере 80 до приблизительно по меньшей мере 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастица, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или минитаблетки. Могут быть необходимы загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. Согласно некоторым вариантам осуществления пероральные составы являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными вещества и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксихенодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-монокапрат, 1додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). Согласно некоторым вариантам осуществления применяют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA.

Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксиэтилен-9лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе распыляемых высушенных частиц, или формируют комплексы с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, пуллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, р-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, интравентрикулярного или внутрипеченочного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как, без ограничения, вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из ряда компонентов, которые включают, без ограничения, предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические составы, описанные в настоящем изобретении, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать согласно традиционным методикам, хорошо известным в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию приведения активных ингредиентов во взаимодействие с фармацевтическим(фармацевтическими) носителем(носителями) или наполнителем(наполнителями). Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного приведения активных ингредиентов во взаимодействие с жидкими носителями или мелкоизмельченными твердыми носителями или и теми, и другими, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Композиции, описанные в настоящем изобретении, могут быть составлены в виде любых из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения, таблеток, капсул, желатиновых капсул, жидких сиропов, пластичных гелей, суппозиториев и клизмы. Композиции также могут быть составлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

# Дополнительные составы Эмульсии

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой, в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 2, p. 335; Higuchi et al. в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301).

Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспрегированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут представлять собой либо эмульсии по типу "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). Альтернативно, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, либо в масляной фазе, либо само по себе в качестве отдельной фазы. При необходимости в эмульсиях могут присутствовать фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, как например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие

сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии о/w включают маленькие водные капельки, составляющие эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью, или она отсутствует. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае мазевых основ, подобных эмульсии, и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть разделены на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные базы и высокодисперные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и они рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, vol. 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом при распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделять на различные классы, исходя из природы гидрофильной групны: неионные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Ророvich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, применяемые в составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные базы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий w/o, с сохранением их полутвердой консистенции. Мелкоизмельченные твердые вещества также применяли в качестве подходящих эмульгаторов, в частности, в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, неразбухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерила тристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий и они вносят вклад в свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 335; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагенан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования крепких межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы, а также путем повышения вязкости дисперсионной фазы

Поскольку эмульсии зачастую содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые легко способствуют росту микроорганизмов, то такие составы зачастую включают консерванты. Широко применяемые консерванты, включенные в составы эмульсий, включают метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные соли аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры пара-гидроксибензойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют к составам эмульсий для предупреждения старения состава. Применяемые антиоксиданты могут представлять собой ловушки свободных радикалов, как, например, токоферолы, алкил галлаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановители, как, например, аскорбиновая

кислота и метабисульфит натрия, и синергистами антиоксидантов, как, например, лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение составов эмульсий с помощью дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 199). Составы эмульсий для пероральной доставки являются очень распространенными для применения в связи с удобством составления, а также с точки зрения эффективности при всасывании и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 245; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира являются одними из материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий о/w.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения композиции iRNA и нуклеиновые кислоты составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая является отдельным оптически изотропным и термодинамически устойчивым жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, B Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 245). Обычно микроэмульсии представляют собой системы, которые получают путем сперва диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи с получением прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung и Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, радез 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. То, является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств применяемого масла и поверхностно-активного вещества, а также от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микро-эмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., vol. 1, p. 335). По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии предлагают преимущество стабилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически устойчивых капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, применяемые для получения микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Вгіј 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (РО500), декаглицерина монокапрат (МСА750), декаглицерина моноолеат (МО750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации со вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и в уровне техники известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, РЕG300, РЕG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать без ограничения материалы, такие как Captex 300, Captex 355, Capmul МСМ, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (С8-С12) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерина, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные С8-С10 глицериды, растительные масла и силиконовое масло

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как o/w, так и w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного повышенной абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести мембран и проницаемости, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердой лекарственной формой, улучшенной клинической действенности и пониженной токсичности (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может быть в особенности преимущественным, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как при косметических, так и при фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий согласно настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальный клеточный захват iRNA и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, применяемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, могут быть классифицированы, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие поверхностно-неактивные вещества (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, р. 92). Каждый из этих классов рассматривался выше.

## Вещества, способствующие проникновению

Согласно одному варианту осуществления в настоящем изобретении используют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к обеспечению диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатриующие поверхностно-неактивные вещества (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, р. 92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан ниже более подробно.

Поверхностно-активные вещества:

В связи с настоящим изобретением поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими структурными единицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего абсорбция iRNA через слизистую повышается. Помимо солей желчных кислот и жирных кислот, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92) и перфторированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Жирные кислоты:

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рацглицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин-1-монокапрат, 1-

додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их  $C_{1-20}$ алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миристат, пальмитат, стеарат, линолеат и т. д.) (см., например, Touitou, E., et al. Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Соли желчных кислот: Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и всасывании липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 B Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, выражение "соли желчных кислот" включают любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любое из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (глихолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидро-фузидат (STDHF) натрия, гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 B Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al, J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al, J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства:

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего абсорбция iRNA через слизистую повышается. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают, без ограничения, двунатриевый этилендиаминтетраацетат (ЕDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), Nацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные P-дикетонов (енамины)(см., например, Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

Нехелатирующие поверхностно-неактивные вещества: Используемые в данном документе нехелатирующие поверхностно-неактивные соединения, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность как хелатирующие средства или как поверхностно-активные вещества, но которые тем не менее повышают абсорбцию iRNA через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, раде 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Средства, которые усиливают захват iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям согласно настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка согласно РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточный захват dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-С™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), peareнт

для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Fugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Тfх™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Тfх™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), peaгент для трансфекции TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec<sup>TM</sup>/LipoGen<sup>TM</sup> (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции ВасиloPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции  $TroganPORTER^{TM}$ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect<sup>тм</sup> (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США)

Для усиления проникновения введенных нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

#### Носители

Определенные композиции согласно настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Используемые в данном документе выражения "соединение-носитель" или "носитель" могут означать нуклеиновую кислоту или ее аналог, которые являются инертными (т.е. не обладают биологической активностью рег se), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты in vivo процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты с биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, перерабатываемой печенью, почками или другими внесосудистыми депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, переработка частично фосфотиоатной dsRNA печеночной тканью может быть снижена при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфокислотой (Міуао et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Taka-kura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183.

### Наполнители

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и т.д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и т.д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металла, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, натрия крахмалгликолат и т.д.); и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не реагируют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для составления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для местного применения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, кото-

рые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

#### Другие компоненты

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при применении в уровнях, установленных в уровне техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического составления композиций согласно настоящему изобретению в различных лекарственных формах, такие как красители, ароматизирующие средства, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако, такие материалы при добавлении не должны чрезмерно вступать в конфликт с биологическими активностями компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы могут быть стерильными и при необходимости их можно смешивать со вспомогательными средствами, например смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или отдушками и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой(нуклеиновыми) кислотой(кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (а) одно или несколько соединений, представляющих собой iRNA, и (b) одно или несколько биологических средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi. Примеры таких биологических средств включают средства, препятствующие взаимодействию ALAS1 и по меньшей мере одного связывающего партнера ALAS1.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсичным и терапевтическим действием представляет собой терапевтический индекс, и его можно выражать как соотношение LD50/ED50. Типичными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах клеточных культур и исследованиях на животных, можно применять при составлении ряда доз для применения у людей. Доза композиций, описанных в настоящем изобретении, как правило, находится в диапазоне концентраций в крови, который включают ED50 с малой токсичностью или юез токсичности. Доза может варьировать в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов на клеточной культуре. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона концентрации в плазме соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC50 (т.е. концентрацию исследуемого соединения, при помощи которой достигают полумаксимальное ингибирование симптомов), при определении на клеточной культуре. Такую информацию можно применять для более точного определения пригодной дозы у людей. Уровни в плазме можно определять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении заболеваний или нарушений, связанных с экспрессией ALAS1. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при применении стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

#### Способы лечения заболеваний, связанных с экспрессией гена ALAS1

Настоящее изобретение относится, в частности, к применению iRNA, нацеленная на ALAS1, для ингибирования экспрессии ALAS1 и/или лечения заболевания, нарушения или патологического процесса, который связан с экспрессией ALAS1.

Используемое в данном документе выражение "нарушение, связанное с экспрессией ALAS1", "заболевание, связанное с экспрессией ALAS1", "патологический процесс, связанный с экспрессией ALAS1" или т. п. включает состояние, нарушение или заболевание, в котором экспрессия ALAS1 изменена (например, повышена), уровень одного или нескольких порфиринов изменен (например, повышен), уровень или активность одного или нескольких ферментов в пути биосинтеза гема (порфириновом пути) изменен, или другие механизмы, которые ведут к патологическим изменениям в пути биосинтезе гема. Например, iRNA, нацеленную на ген ALAS1 или ее комбинацию, можно применять для лечения состояний, в которых уровни порфирина или предшественника порфирина (например, ALA или PBG) повышены (например, определенные порфирии), или состояний, в которых имеются нарушения ферментов пути биосинтеза гема (например, определенные порфирии). Нарушения, связанные с экспрессией ALAS1, включают, например, X-сцепленную сидеробластическую анемию (XLSA), порфирию, обусловленную недостаточностью ALA (порфирию Досса), острую перемежающуюся порфирию (AIP), врожденную эритропоэтическую порфирию, позднюю кожную порфирию, наследственную копропорфирию (копропорфирию), вариегатную порфирию, эритропоэтическую протопорфирию (EPP) и транзиторную эритропорфирию детского возраста.

Используемое в данном документе выражение "субъект", подлежащий лечению согласно способам, описанным в данном документе, включает человека или отличное от человека животное, например, млекопитающее. Млекопитающим может быть, например, грызун (например, крыса или мышь) или примат (например, обезьяна). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает нарушением, связанным с экспрессией ALAS1 (например, с диагностированной порфирией или испытывал один или несколько симптомов порфирии и является носителем мутации, связанной с порфирией) или подвержен риску развития нарушения, связанного с экспрессией ALAS1 (например, субъект с семейной историей порфирии или субъект, который является носителем генетической мутации, связанной с порфирией).

Классификации порфирии, в том числе острых печеночных порфирии, описаны, например, в Balwani, М. & Desnick, R.J., Blood, 120(23), опубликованном online в виде Blood First Edition paper, 12, 102; DOI 10.1182/blood-2012-05-423186. Как описано в Balwain & Desnick, острая перемежающаяся порфирия (AIP), наследственная копропорфирия (HCP), вариегатная порфирия (VP) являются аутосомнодоминантными порфириями, а порфирия, обусловленная недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP), является аутосомно-рецессивной. В редких случаях AIP, HCP и VP возникают как гомозиготные доминантные формы. Кроме того, существует редкая гомозиготная рецессивная форма поздней кожной порфирии (PCT), которая является единственной печеночно-кожной порфирией и также известной как гепатоэритропоэтическая порфирия. Клинические и лабораторные характеристики этих порфирии описаны ниже в табл. 11.

Таблица 11. Печеночные порфирии человека: клинические и лабораторные характеристики

Порфирия	Фермент с	Наследова	Основные	Активно	Повышенное содержание предшественников		
	недостаточн	ние	симптомы,	сть	порфиринов и/или порфиринов*		
	остью		NV или CP	фермент			
				a, %	Эритроциты Моча К	ал	
				нормы			
Острые пече	ночные порфира	ии					
ADP	ALA-	AR	NV	~5	Zn-протопорфирин	ALA,	_
	дегидратаза					копропорфири	
	1					нIII	
AIP	HMB-	AD	NV	~50	_	ALA, PBG,	_
	синтаза					уропорфирин	
HCP	COPRO-	AD	NV и CP	~50	_	ALA, PBG,	копропор
	оксидаза					копропорфири	фирин III
						нIII	
VP	PROTO-	AD	NV и CP	~50	_	ALA, PBG,	копропор
	оксидаза					копропорфири	фирин III,
						нIII	протопор
							фирин
Печеночно-н	кожные порфири	И					
PCT	URO-	Спорадиче	CP	<20	_	уропорфирин	уропорфи
	декарбоксил	ская или				, порфирин-	рин,
	аза	AD				7-	порфирин
						карбоксилат	-7-
						_	карбокси
							лат

AR означает аутосомно-рецессивный;

AD - аутосомно-доминантный;

NV - нейровисцеральный;

СР - кожная фоточувствительность и не применимо.

\*Повышения, которые могут быть важны для диагноза.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например AIP, HCP, VP, ADP или гематоэритропоэтической порфирии.

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой острую печеночную порфирию, например, острую печеночную порфирию выбирают из острой перемежающейся порфирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP) и порфирии, обусловленной недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP).

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой двойную порфирию, например, по меньшей мере две формы порфирии. Согласно некоторым вариантам осуществления двойная порфирия представляет две или более форм порфирии, выбранных из острой перемежающейся пор-

фирии (AIP), наследственной копропорфирии (HCP), вариегатной порфирии (VP) и порфирии, обусловленной недостаточностью ALA-дегидратазы (ADP).

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой гомозиготную доминатную печеночную порфирию (например, гомозиготную доминантную AIP, HCP или VP) или гепатоэритропоэтическую порфирию. Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой AIP, HCP, VP или гепатоэритропоэтическую порфирию или их комбинацию (например, двойную порфирию). Согласно некоторым вариантам осуществления AIP, HCP или VP является либо гетерозиготной доминантной либо гомозиготной доминантной.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет порфирию или имеет риск развития порфирии, например, ADP, и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в моче) ALA и/или копропорфирина III. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например ADP, и характеризуется повышенным уровнем Zn-протопорфирина в эритроцитах.

Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например, AIP, и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в моче) ALA, PBG и/или уропорфирина.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет порфирию или имеет риск развития порфирии, например, HCP, и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в моче) ALA, PBG и/или копропорфирина III. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например HCP, и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в кале) копропорфирина III.

Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например VP, и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в моче) ALA, PBG и/или копропорфирина III.

Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например НСР, и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в кале) копропорфирина III и/или протопорфирина.

Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например, РСТ (например, гепатоэритропоэтической порфирии), и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в моче) уропорфирина и/или порфирин-7-карбоксилата. Согласно вариантам осуществления субъект страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например РСТ (например, гепатоэритропоэтической порфирии), и характеризуется повышенным уровнем (например, повышенным уровнем в кале) уропорфирина и/или порфирин-7-карбоксилата.

Мутация, связанная с порфирией, включает любую мутацию в гене, кодирующем фермент в пути биосинтеза порфирина (порфириновый путь), или гена, который изменяет экспрессию гена в пути биосинтеза гема. Согласно многим вариантам осуществления субъект несет одну или несколько мутаций в ферменте порфиринового пути (например, мутацию в ALA-дегидратазе или PBG-дезаминазе). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает острой порфирией (например, AIP, порфирией, обусловленной недостаточностью ALA-дегидратазы).

В некоторых случаях пациенты с острой печеночной порфирией (например, AIP) или пациенты, которые несут мутации, ассоциированные с острой печеночной порфирией (например, AIP), но у которых не наблюдаются симптомы, имеют повышенные уровни ALA и/или PBG по сравнению со здоровыми индивидами. См., например, Floderus, Y. et al, Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006; Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007. В таких случаях уровень ALA и/или PBG может быть повышен даже в том случае, если пациента не страдает от приступа или никогда не страдал. В некоторых таких случаях у пациента, в остальном, полностью не наблюдаются симптомы. В некоторых таких случаях пациент испытывает болевые ощущения, например, нейропатическую боль, которая может представлять собой хроническую боль (например, хроническую нейропатическую боль). В некоторых случаях пациент страдает от нейропатии. В некоторых случаях пациент страдает от прогрессирующей нейропатии.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который подлежит лечению согласно способам, описанным в данном документе, имеет повышенный уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG. Уровни порфирина или предшественника порфирина могут быть оценены при помощи способов, известных из уровня техники, или способов, описанных в данном документе. Например, способы оценки уровней ALA и PBG в моче и плазме, а также уровней порфиринов в моче и плазме, раскрыты в Floderus, Y. et al, Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006; и Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007; полное содержание которых тем самым включено в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой животную модель порфирии, например мышиную модель порфирии (например, мутантную мышь, описанную в Lindberg et al. Nature Genetics, 12: 195-199, 1996). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек, например человек, который страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, как описано в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта не страдает от

острого приступа порфирии. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент испытывает хроническую боль. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент испытывает хроническую боль. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент страдает от повреждения нервов. Согласно вариантам осуществления у субъекта наблюдаются изменения ЕМG и/или изменения в скорости проводимости нерва. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта не наблюдаются симптомы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвержен риску развития порфирии (например, имеет мутацию гена, ассоциированную с порфирией), но у него не наблюдаются симптомы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее страдал от острого приступа, но у него не наблюдаются симптомы во время лечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвержен риску развития порфирии и получает профилактическое лечение для предупреждения развития порфирии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет повышенный уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG. Согласно некоторым вариантам осуществления профилактическое лечение начинается в период полового созревания. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает уровень (например, уровень в плазме или уровень в моче) порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение предупреждает развитие повышенного уровня порфирина или предшественника порфирина, например ALA и/или PBG. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение предупреждает развитие симптома, ассоциированного с порфирией, например болевого ощущения или повреждения нервов, или снижает частоту или тяжесть симптомов.

Согласно некоторым вариантам осуществления уровень порфирина или предшественника порфирина, например ALA или PBG, повышен, например, в образце плазмы или мочи от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG, у субъекта оценивают на основе абсолютного уровня порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG, в образце от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG, в образце от субъекта оценивают на основе относительного уровня порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG, в образце от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления относительный уровень представлен относительно уровня другого белка или соединения, например, уровня креатинина, в образце от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец мочи. Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец плазмы. Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец плазмы. Согласно некоторым вариантам осуществления образец кала.

Повышенный уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG, может быть установлен, например, путем демонстрации того, что субъект имеет уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG (например, уровень ALA и/или PBG в плазме или моче), который выше нормального значения или выше или равен нормальному значению. Врач с опытом лечения порфирий сможет определить, является ли уровень порфирина или предшественника порфирина (например, ALA и/или PBG) повышенным, например, с целью диагностирования порфирий или для определения того, подвержен ли субъект риску развития порфирий, например, субъект может иметь предрасположенность к острому приступу или к патологии, ассоциированной с порфирией, такой как, например, хроническая боль (например, нейропатическая боль) и нейропатия (например, прогрессирующая нейропатия).

Используемое в данном документе выражение "нормальное значение" относится к значению, полученному от субъекта, когда субъект не находится в состоянии заболевания, или значению, полученному от субъекта с нормальными показателями или здорового субъекта, или значению, полученному от эталонной выборки или популяции, например, группы субъектов с нормальными показателями или здоровых субъектов (например, группы субъектов, которые не несут мутацию, ассоциированную с порфирией, и/или группы субъектов, которые не испытывают симптомов, ассоциированных с порфирией).

Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет собой уровень до болезни у одного и того же индивида. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет собой уровень в эталонной выборке или популяции. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет среднее или медианное значение в эталонной выборке или популяции. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет собой значение, равное двум стандартным отклонениям выше среднего в эталонной выборке или популяции. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет собой значение, которое равно 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 стандартным отклонениям выше среднего в эталонной выборке или популяции.

Согласно некоторым вариантам осуществления, где субъект имеет повышенный уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG, субъект имеет уровень ALA и/или PBG, который по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% выше нормального значения. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG, который по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше нормаль-

ного значения.

Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение соответствует верхнему пределу нормального диапазона значений. Используемый в данном документе "верхний предел нормального диапазона значений" относится к уровню, который представляет собой верхний предел 95% доверительного интервала для эталонной выборки или популяции, например, группы индивидов с нормальными показателями (например, дикого типа) или здоровых индивидов, например, индивидов, которые не несут генетическую мутацию, ассоциированную с порфирией, и/или индивидов, которые не страдают порфирией. Соответственно, нижний предел нормального диапазона значений относится к уровню, который представляет собой нижний предел того же 95% доверительного интервала.

Согласно некоторым вариантам осуществления, где субъект имеет повышенный уровень, например, уровень в плазме или уровень в моче, порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG, этот уровень выше или равен 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному или 5-кратному уровню относительно нормального значения, например, верхнего предела нормального диапазона значений. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG, в моче, который составляет выше 4-кратного уровня относительно верхнего предела нормального диапазона значений.

Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет собой значение, представленное в Floderus, Y. et al, Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006 или Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007. Согласно некоторым вариантам осуществления нормальное значение представляет собой значение, представленное в табл. 1 Sardh et al.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень PBG в моче, который выше или равен 4,8 ммоль/моль креатинина. Согласно определенным вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень PBG в моче, который выше, или выше или равен 3, 4, 5, 6, 7 или 8 ммоль/моль креатинина.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для PBG в плазме составляет 0,12 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень PBG в плазме, который выше, или выше или равен 0,10, 0,12, 0,24, 0,36, 0,48 или 0,60 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень PBG в плазме, который выше, или выше или равен 0,48 мкмоль/л.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для PBG в моче составляет 1,2 ммоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень PBG в моче, который выше, или выше или равен 1,0, 1,2 ммоль/моль креатинина, 2,4 ммоль/моль креатинина, 3,6 ммоль/моль креатинина, 4,8 ммоль/моль креатинина или 6,0 ммоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень PBG в моче, который выше, или выше или равен 4,8 ммоль/моль креатинина.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для ALA в плазме составляет 0,12 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень ALA в плазме, который выше, или выше или равен 0.10, 0,12, 0,24, 0,36, 0,48 или 0,60 мкмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень ALA в плазме, который выше, или выше или равен 0,48 мкмоль/л.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для ALA в моче составляет 3,1 ммоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень ALA в моче, который выше, или выше или равен 2,5 ммоль/моль креатинина, 3,1 ммоль/моль креатинина, 6,2 ммоль/моль креатинина, 9,3 ммоль/моль креатинина, 12,4 ммоль/моль креатинина или 15,5 ммоль/моль креатинина.

Согласно вариантам осуществления нормальное значение для порфирина в плазме составляет 10 нмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень порфирина в плазме, который выше, или выше или равен 10 нмоль/л. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень порфирина в плазме, который выше, или выше или равен 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 нмоль/л. Субъектом является человек, и субъект имеет уровень порфирина в плазме, который выше, или выше или равен 40 нмоль/л. Согласно вариантам осуществления нормальное значение для порфирина в моче составляет 25 мкмоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек и субъект имеет уровень порфирина в моче, который выше, или выше или равен 25 мкмоль/моль креатинина. Согласно вариантам осуществления субъектом является человек, и субъект имеет уровень порфирина в моче, который выше или равен 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 мкмоль/моль креатинина.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень, например уровень в плазме или уровень в моче, порфирина или предшественника порфирина, например ALA или PBG, который выше чем уровень 99% индивидов в выборке здоровых индивидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень, например, уровень в плазме или уровень в моче, ALA или PBG, который выше на два стандартных отклонения среднего уровня в выборке здоровых индивидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень ALA в моче, который составляет 1,6 или более кратный уровень относительно среднего уровня у субъекта с нормальными показателями (например, субъекта, который не несет мутацию, ассоциированную с порфирией). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень ALA в плазме, который составляет 2- или 3-кратный уровень относительно среднего уровня у субъекта с нормальными показателями. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень PBG в моче, который составляет четыре или более кратный уровень относительно среднего уровня у субъекта с нормальными показателями. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет уровень PBG в плазме, который составляет четыре или более кратный уровень относительно среднего уровня у субъекта с нормальными показателями.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ является эффективным для снижения уровня порфирина или предшественника порфирина, например, ALA и/или PBG. Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для получения заранее определенного снижения повышенного уровня порфирина или предшественника порфирина, например, ALA или PBG. Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50%. Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение, которое эффективно для предупреждения или облегчения симптомов, например, болевых ощущений или рецидивирующих приступов.

Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение, которое составляет по меньшей мере 1,2,3 или более стандартных отклонений, где стандартное отклонение определяют на основе значений из эталонной выборки, например, эталонной выборки, описанной в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение, которое доводит уровень порфирина или предшественника порфирина до уровня, который меньше нормального значения, или до уровня, который меньше или равен нормальному значению (например, нормальному значению, описанному в данном документе).

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который подлежит лечению согласно описанным способам, испытывает болевые ощущения, например, хроническую боль. Согласно некоторым вариантам осуществления страдает порфирией или подвержен риску развития порфирии, например, острой печеночной порфирии, например, АІР. Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для лечения болевых ощущений, например, путем уменьшения тяжести болевых ощущений или излечения болевых ощущений. Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для снижения или предупреждения повреждения нервов.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который подлежит лечению согласно способам, описанным в данном документе, (а) имеет повышенный уровень ALA и/или PBG, и (b) испытывает болевые ощущения, например, хроническую боль. Согласно вариантам осуществления способ является эффективным для снижения повышенного уровня ALA и/или PBG, и/или для лечения болевых ощущений, например, путем уменьшения тяжести болевых ощущений или излечения болевых ощущений.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является животное, которое служит в качестве модели нарушения, связанного с экспрессией ALAS1.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является животное, которое служит в качестве модели порфирии (например, генетически модифицированное животное с одним или несколькими мутациями). Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой АІР, и субъектом является животная модель АІР. Согласно одному такому варианту осуществления субъектом является генетически модифицированная мышь, которая характеризуется недостаточностью порфобилиногендезаминазы, например, такая как мышь, описанная в Lindberg et al., Nature Genetics, 12:195-199, 1996, или гомозиготная мышь R167Q, описанная в Yasuda, M., Yu, C. Zhang, J., Clavero, S., Edelmann, W., Gan, L., Phillips, J.D., & Desnick, R.J. Acute intermittent porphyria: A severely affected knock-in mouse that mimics the human homozygous dominant phenotype. (резюме презентации, представленной 14 октября 2011 г. в Американском обществе генетики человека; № 1308F в программе; доступно он-лайн с 4 апреля 2012 года на ichg201 l.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=21167); оба из этих источников тем самым включены в данный документ во всей своей полноте. Были получены несколько моделей с нокином для обеспечения мутаций, вызывающих гомозиготную доминантную ALP у человека. Используемые мутации включают, например, R167Q, R173Q и R173W в PBG-дезаминазе. Жизнеспособные гомозиготы включали R167Q/R176Q и R167Q/R173Q, обе которые проявляют постоянно повышенные уровни ALA и PBG, аналогичные фенотипу при гомозиготной доминантной ALP человека; согласно некоторым вариантам осуществления субъект является такой жизнеспособной мышиной моделью гомозиготной АІР.

Согласно одному варианту осуществления субъект, который подлежит лечению согласно методам, описанным в данном документе (например, субъект-человек или пациент-человек), подвержен риску развития нарушения, связанного с экспрессией ALAS1, или у него диагностировано нарушение, связанное с экспрессией ALAS1, например, порфирия. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является субъект, который испытывал один или несколько острых приступов с одним или несколькими симптомами порфирии. Согласно другим вариантам осуществления субъектом является субъект,

который хронически испытывал один или несколько симптомов порфирии (например, болевые ощущения, например, нейропатическую боль, и/или нейропатию, например, прогрессирующую нейропатию). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет генетическое изменение (например, мутацию), описанное в данном документе, но, в остальном, у него не наблюдаются симптомы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее подвергался лечению препаратом на основе гема (например, гемином, аргинатом гема или гемальбумином), описанным в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект (например, субъект с порфирией, такой как, например, AIP), который подлежит лечению согласно способам, описанным в данном документе, недавно испытывал или в настоящее время испытывает продром. Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъекту вводят комбинированное лечение, например, iRNA, описанную в данном документе, и один или несколько дополнительных лекарственных препаратов, которые, как известно, являются эффективными против порфирии (например, глюкоза и/или препарат на основе гема, такой как гемин, описанный в данном документе) или ассоциированных с ней симптомов.

Согласно одному варианту осуществления iRNA, описанную в данном документе, вводят в комбинации с глюкозой или декстрозой. Например, может предусматриваться внутривенное введение 10-20% декстрозы в физиологическом растворе. Как правило, если вводится глюкоза, по меньшей мере 300 г 10% глюкозы вводят внутривенно ежедневно. iRNA (например, iRNA в составе LNP) можно также вводить внутривенно, как часть той же инфузии, которую используют для введения глюкозы или декстрозы, или в виде отдельной инфузии, которую вводят до, одновременно или после введения глюкозы или декстрозы. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят при помощи другого пути введения пример, подкожно). Согласно еще одному варианту осуществления iRNA вводят в комбинации с полным парентеральным питанием. iRNA можно вводить до, одновременно или после введения полного парентерального питания.

Согласно одному варианту осуществления iRNA вводят в комбинации с препаратом на основе гема (например, гемином, аргинатом гема или гемальбумином). Согласно дополнительному варианту осуществления iRNA вводят в комбинации с препаратом на основе гема и глюкозой, препаратом на основе гема и декстрозой или препаратом на основе гема и полным парентеральным питанием.

Используемое в данном документе выражение "продром" предусматривает любой симптом, который отдельный субъект испытывал заранее, непосредственно перед развитием острого приступа. Типичные симптомы продрома включают, например, боль в животе, тошноту, головные боли, психологические симптомы (например, тревожность), возбужденное состояние и/или бессонницу. Согласно некоторым вариантам осуществления во время продрома субъект испытывает болевые ощущения (например, боль в животе и/или головную боль). Согласно некоторым вариантам осуществления во время продрома субъект испытывает тошноту. Согласно некоторым вариантам осуществления во время продрома субъект испытывает психологические симптомы (например, тревожность). Согласно некоторым вариантам осуществления во время продрома субъект становится возбужденным и /или страдает от бессонницы.

Острый "приступ" порфирии включает проявление одного или нескольких симптомов порфирии, как правило, у пациента, который имеет мутацию, ассоциированную с порфирией (например, мутацию в гене, который кодирует фермент в порфириновом пути).

Согласно определенным вариантам осуществления введение iRNA ALAS1 приводит к снижению уровня одного или нескольких порфиринов или предшественников порфиринов, описанных в данном документе (например, ALA и/или PBG). Снижение может измерять относительно соответствующего контрольного или нормального значения. Например, снижение уровня одного или нескольких порфиринов или предшественников порфиринов можно установить у отдельного субъекта, например, как снижение по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% или более по сравнению с уровнем, который наблюдался до лечения (например, непосредственно перед лечением). Снижение уровня предшественника порфирина, порфирина или метаболита порфирина можно измерять при помощи любого способа, известного из уровня техники. Например, уровень PBG и/или ALA в моче или плазме можно оценивать при помощи теста Уотсона-Шварца, ионообменной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии. См., например, Thunell (1993).

Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для снижения уровня ALA и/или PBG у субъекта. Уровень ALA или PBG у субъекта можно оценивать, например, на основе абсолютного уровня ALA или PBG, или на основе относительного уровня ALA или PBG (например, относительно уровня другого белка или соединения, например, уровня креатинина) в образце от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец мочи. Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец плазмы.

Согласно определенным вариантам осуществления iRNA, которая нацелена на ALAS1, вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными препаратами, например, другим препаратом, который, как известно, является эффективным в лечении порфирии или симптомов порфирии. Например, другим лекарственным препаратом может быть глюкоза (например, IV глюкоза) или препарат на основе гема (например, гемин, аргинат гема или гемальбумин). Дополнительный лекарственный препарат(ы) можно вводить до, после или одновременно с введением iRNA.

iRNA и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в комбинации в одной и той же композиции, например, внутривенно, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или другим способом, описанным в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение iRNA или введение iRNA в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными препаратами (например, глюкозой, декстрозой и т.п.), снижает частоту острых приступов (например, путем предупреждения острых приступов так, что они больше не возникают, или путем снижения числа приступов, которые возникают в определенный период времени, например, меньшее число приступов возникает за год). Согласно некоторым таким вариантам осуществления iRNA вводят согласно схеме дозирования с регулярными интервалами, например, ежедневно, еженедельно, раз в две недели или раз в месяц.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят после острого приступа порфирии. Согласно некоторым таким вариантам осуществления iRNA находится в композиции, например, композиции, содержащей липидный состав, например состав LNP.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят во время острого приступа порфирии. Согласно некоторым таким вариантам осуществления iRNA находится в композиции, например, композиции, содержащей липидный состав (например, состав LNP), или композиции, содержащей конъюгат GalNAc.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для снижения тяжести приступа (например, путем облегчения одного или нескольких признаков или симптомов, ассоциированных с приступом). Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для сокращения продолжительности приступа. Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для прекращения приступа. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят профилактически для предупреждения острого приступа порфирии. Согласно некоторым таким вариантам осуществления iRNA находится в форме конъюгата GalNAc, например, в композиции, содержащей конъюгат GalNAc. Согласно некоторым вариантам осуществления профилактическое введение выполняют до, во время или после воздействия или возникновения провоцирующего фактора. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвержен риску развития порфирии.

Согласно некоторым вариантам осуществления siRNA вводят во время продрома. Согласно некоторым вариантам осуществления продром характеризуется болевыми ощущениями (например, головной болью и/или болью в животе), тошнотой, психологическими симптомами (например, тревожностью), возбужденным состоянием и/или бессонницей.

Согласно некоторым вариантам осуществления siRNA вводят во время определенной фазы менструального цикла, например, во время лютеиновой фазы.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для предупреждения приступов (например, рецидивирующих приступов, которые ассоциированы с продромом и/или с провоцирующим фактором, например, с определенной фазой менструального цикла, например, лютеиновой фазой). Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для снижения частоты приступов. Согласно вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для снижения тяжести приступа (например, путем облегчения одного или нескольких признаков или симптомов, ассоциированных с приступом). Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для сокращения продолжительности приступа. Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для прекращения приступа.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для предупреждения или снижения частоты или тяжести болевых ощущений, например, нейропатической боли.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение siRNA ALAS1 является эффективным для предупреждения или снижения частоты или тяжести нейропатии.

Эффекты введения siRNA ALAS1 могут быть установлены, например, путем сравнения с соответствующим контролем. Например, снижение частоты острых приступов, а также снижение уровня одного или нескольких порфиринов или предшественников порфиринов у группы пациентов с AIP может быть установлено, например, как пониженная частота по сравнению с соответствующей контрольной группой. Контрольная группа (например, группа из подобных индивидов или та же группа индивидов в перекрестном исследовании) может включать, например, популяцию, не получавшую лечения, популяцию, которую лечили при помощи традиционного лекарственного препарата от порфирии (например, традиционный лекарственный препарат от AIP может включать глюкозу, гемин или оба); популяцию, которую лечили при помощи плацебо или нецелевой iRNA, необязательно в комбинации с одним или несколькими традиционными лекарственными препаратами от порфирии (например, глюкозой, например, IV глюкозой) и т.п.

Используемое в данном документе выражение "подверженный риску" развития порфирии включает субъекта со случаями заболевания порфирией в семье и/или одним или несколькими рецидивирующими

или хроническими симптомами порфирии в анамнезе, и/или субъекта, который имеет генетическое изменение (например, мутацию) в гене, кодирующем фермент в рамках пути биосинтеза гема, и субъекта, который имеет генетическое изменение, например, мутацию, которая, как известно, ассоциирована с порфирией.

Согласно вариантам осуществления изменение, например мутация, способствует восприимчивости индивида к острому приступу (например, при воздействии провоцирующего фактора, например, лекарственного средства, пребывания на диете или другого провоцирующего фактора, например, провоцирующего фактора, раскрытого в данном документе). Согласно вариантам осуществления изменение, например мутация, ассоциировано с повышенными уровнями порфирина или предшественника порфирина (например, ALA и/или PBG). Согласно вариантам осуществления изменение, например мутация, ассоциировано с хронической болью (например, хронической нейропатической болью) и/или нейропатией (например, прогрессирующей нейропатией). Согласно вариантам осуществления изменение, например мутация, ассоциировано с изменениями EMG и/или скорости проводимости нервов.

Согласно вариантам осуществления изменение представляет собой мутацию в гене ALAS1. Согласно вариантам осуществления изменение представляет собой мутацию в промоторе гена ALAS1 или в участках, расположенных выше или ниже гена ALAS1. Согласно вариантам осуществления изменение представляет собой мутацию в факторах транскрипции или других генах, которые взаимодействуют с ALAS1. Согласно вариантам осуществления изменение представляет собой изменение, например мутацию, в гене, который кодирует фермент в рамках пути биосинтеза гема.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет генетическое изменение, описанное в данном документе (например, генетическую мутацию, которая, как известно, ассоциирована с порфирией). Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъект имеет повышенный уровень (например, уровень в моче или плазме) ALA и/или PBG. Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъект не имеет повышенный уровень ALA и/или PBG. Согласно вариантам осуществления субъект имеет генетическое изменение, описанное в данном документе, и имеет другие симптомы, например, хроническую боль, изменения EMG, изменения скорости проводимости нервов и/или другие симптомы, ассоциированные с порфирией. Согласно вариантам осуществления субъект имеет генетическое изменение, но не испытывает острых приступов.

Согласно вариантам осуществления субъект имеет мутацию, ассоциированную с AIP, HCP, VP или ADP.

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой AIP. Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъект имеет изменение, например, по меньшей мере одну мутацию, в гене PBG-дезаминазы. Многие мутации PBG-дезаминазы известны из уровня техники, например, описанные в Hrdinka, M. et at. Physiological Research, 55 (Suppl 2):S119-136 (2006). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является гетерозиготным по мутации PBG-дезаминазы. Согласно другим вариантам осуществления субъект является гомозиготным по мутации PBG-дезаминазы. Гомозиготный субъект может иметь две идентичные мутации или две различные мутации в гене PBG-дезаминазы.

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой НСР. Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъект имеет изменение, например по меньшей мере одну мутацию, в гене, который кодирует фермент копропорфириноген III оксидазу.

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой VP. Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъект имеет изменение, например по меньшей мере одну мутацию, в гене, который кодирует протопорфириногеноксидазу.

Согласно вариантам осуществления порфирия представляет собой ADP, например аутосомнорецессивную ADP. Согласно некоторым таким вариантам осуществления субъект имеет изменение, например по меньшей мере одну мутацию, в гене, который кодирует ALA-дегидратазу.

Способы лечения, представленные в данном документе, могут служить для облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, снижения частоты приступов, ассоциированных с порфирией, снижения вероятности того, что приступ, состоящий из одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, возникнет при воздействии провоцирующего фактора, и/или снижения риска развития состояний, ассоциированных с порфирией (например, нейропатии (например, прогрессирующей нейропатии), гепатоцеллюлярного рака). Кроме того, способы, представленные в данном документе, могут служить для снижения уровня одного или нескольких предшественников порфиринов, порфиринов и/или связанных продуктов или метаболитов порфирина. Уровень предшественника порфирина или порфирина можно измерять в любом биологическом образце, таком как, например, моча, кровь, кал, спинномозговая жидкость или образец ткани. Образец может находиться в субъекте или может быть получен или выделен из субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления порфирия представляет собой АІР, а уровень РВG и/или АLА снижен. Согласно некоторым вариантам осуществления продукт или метаболит порфирина представляет собой порфобилин, порфобилиноген или уропорфирин. Снижение уровня продукта или метаболита порфирина можно измерять при помощи любого способа, известного из уровня техники. Например, уровень РВG и/или АLА в моче или плазме можно оценивать при по-

мощи теста Уотсона-Шварца, ионообменной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии. См., например, Thunell (1993).

Способы, описанные в данном документе, могут также служить для снижения хронически повышенных уровней предшественников порфиринов (например, ALA и/или PBG) у субъектов, страдающих порфирией (например, острой печеночной порфирией, например, AIP) или подверженных риску развития порфирии. Способы оценки уровней (например, хронически повышенных уровней) предшественников порфиринов в плазме и моче включают, например, HPLC-масс-спектрометрию и ионообменную хроматографию. Уровни предшественников порфиринов можно выражать в виде уровня относительно другого белка или соединения, например, креатинина. См., например, Floderus, Y. et al, Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006; Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007.

Используемое в данном документе выражение "провоцирующий фактор" относится к эндогенному или экзогенному фактору, который может индуцировать острый приступ, состоящий из одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией. Провоцирующие факторы включают голодание (или другие формы пониженной или недостаточной калорийности потребляемой пищи вследствие жестких диет, занятий спортом, связанных с длинными дистанциями и т. д.), формы стресса, связанные с метаболизмом (например, инфекции, оперативное вмешательство, международные авиаперелеты и психологический стресс), эндогенные гормоны (например, прогестерон), курение сигарет, жирорастворимые чужеродные химические соединения (в том числе, например, химические соединения, присутствующие в табачном дыме, определенные лекарственные средства рецептурного отпуска, органические растворители, биоциды, соединения в алкогольных напитках), эндокринные факторы (например, половые гормоны (женщины могут испытывать обострения болезни во время менструального периода), синтетические эстрогены, прогестероны, стимуляторы овуляции и гормональная заместительная терапия). См., например, Thunell (1993). Распространенные провоцирующие факторы включают лекарственные средства, индуцирующие цитохром Р450, и фенобарбитал.

Симптомы, ассоциированные с порфирией, могут включать боль или спазмы в животе, головные боли, эффекты, вызыванные патологиями нервной системы, и светочувствительность, вызывающую появление сыпи, образование волдырей и рубцов на коже (фотодерматит). Согласно определенным вариантам осуществления порфирия представляет собой AIP. Симптомы AIP включают симптомы, связанные с желудочно-кишечным трактом (например, сильная и плохо локализуемая боль в животе, тошнота/рвота, запор, диарея, непроходимость кишечника), симптомы, связанные с мочевой системой (дизурия, задержка мочеиспускания/недержание мочи или темная моча), неврологические симптомы (например, сенсорная нейропатия, моторная нейропатия (например, поражающая черепные нервы и/или приводящая к слабости мышц в руках или ногах), судороги, нейропатическую боль, прогрессирующую нейропатию, головные боли, нейропсихиатрические симптомы (например, спутанность сознания, тревожность, возбуждение, галлюцинация, истерия, делирий, апатия, депрессия, фобии, психоз, бессонница, сонливость, кома), вовлечение автономной нервной системы (приводящее, например, к симптомам, связанным с сердечно-сосудистой системой, таким как тахикардия, гипертензия и/или аритмии, а также другим симптомам, таким как, например, повышенные уровни катехоламинов в крови, потение, возбужденность и/или тремор), обезвоживание и нарушения баланса электролитов.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA, нацеленную на ALAS1, вводят вместе (например, до, после или одновременно) с другим лекарственным препаратом, который может служить для ослабления одного или нескольких из упомянутых выше симптомов. Например, боль в животе можно лечить, например, наркотическими анальгетиками, судороги можно лечить, например, противосудорожными препаратами, тошноту/рвоту можно лечить, например, фенотиазинами, и тахикардию/гипертензию можно лечить, например, бета-блокаторами.

Выражение "снижать" (или "повышать"), как предполагается, относится к измеряемому изменению, например, статистически значимому изменению. Изменение может составлять, например, изменение (например, снижение (или повышение) относительно нормального значения, например, эталонной величины, где iRNA не вводят) по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50% или более.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению iRNA или фармацевтической композиции на ее основе, например, для лечения нарушения, связанного с экспрессией ALAS1, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими способами, например,
с известными фармацевтическими препаратами и/или известными терапевтическими способами, такими
как, например, применяемые в настоящее время для лечения нарушения. Согласно одному варианту
осуществления iRNA или фармацевтическую композицию на ее основе можно вводить совместно с препаратом на основе гема (например, гемином, аргинатом гема или гемальбумином, описанными в данном
документе) и/или совместно с внутривенными инфузиями глюкозы. Согласно некоторым вариантам
осуществления iRNA или фармацевтическую композицию на ее основе применяют профилактически,
например, для предупреждения или облегчения симптомов прогнозируемого приступа острой порфирии.
Профилактическое применение может планироваться по времени в соответствии с воздействием или
прогнозируемым воздействием провоцирующего фактора на субъекта. Описанный в данном документе
провоцирующий фактор может представлять собой любой эндогенный или экзогенный фактор, который,

как известно, провоцирует острый приступ. Например, предменструальная фаза представляет собой эндогенный провоцирующий фактор, а лекарственное средство, провоцирующее цитохром P450, представляет собой экзогенный провоцирующий фактор.

Количество, эффективное для лечения нарушения, связанного с экспрессией ALAS1 (например, порфирии, такой как АІР), зависит от типа нарушения, подлежащего лечению, тяжести симптомов, субъекта, который подлежит лечению, пола, возраста и общего состояния субъекта, способа введения и т.д. Для каждого отдельно взятого случая соответствующее "эффективное количество" может определить специалист в данной области с помощью стандартного проведения экспериментов. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких показателей или любой комбинации показателей относится к компетенции специалиста в данной области. Применительно к введению iRNA, нацеленной на ALAS1, или фармацевтической композиции на ее основе выражение "эффективный против" нарушения, связанного с экспрессией ALAS1, указывает, что введение способом, принятым в клинической практике, приводит к благоприятному эффекту, например, для отдельного пациента или по меньшей мере для части пациентов, например, статистически значимой части пациентов. Благоприятные эффекты включают, например, предупреждение или снижение симптомов, или другие эффекты. Например, благоприятные эффекты включают, например, улучшение (например, снижение тяжести или частоты) симптомов, снижение тяжести или частоты приступов, сниженный риск развития сопутствующего заболевания (например, нейропатии (например, прогрессирующей нейропатии), гепатоцеллюлярного рака), повышенную способность переносить провоцирующий фактор, улучшение качества жизни, снижение экспрессии ALAS1, снижение уровня (например, уровня в плазме или моче) порфирина или предшественника порфирина (например, ALA и/или PBG) или другой эффект, как правило, расцениваемый как положительный лечащими врачами, хорошо осведомленными в лечении определенного типа нарушения.

Эффект лечения или предупреждения является очевидным, когда наблюдается улучшение, например, статистически значимое улучшение, одного или нескольких показателей болезненного состояния, или когда отсутствует усугубление или развитие симптомов в тех случаях, когда, при иных обстоятельствах, они прогнозировались. В качестве примера, положительное изменение измеряемого показателя заболевания по меньшей мере на 10%, например, по меньшей мере на 20, 30, 40, 50% или более, может служить признаком эффективного лечения. Об эффективности данного лекарственного средства на основе iRNA или состава с таким лекарственным средством можно также судить при помощи экспериментальной животной модели данного заболевания, которая известна из уровня техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения подтверждается, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера (например, ALA или PBG в плазме или моче) или ослабление симптома.

Пациентам можно вводить терапевтическое количество iRNA. Терапевтическое количество может составлять, например, 0.05-50 мг/кг. Например, терапевтическое количество может составлять 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0 или 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/кг dsRNA.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA составлена в виде липидного состава, например, состава LNP, описанного в данном документе. Согласно некоторым таким вариантам осуществления терапевтическое количество может составлять 0,05-5 мг/кг, например, 0,05,01,0,2,0,3,0,4,0,5,0,6,0,7,0,8,0,9,1,0,1,5,2,0,2,5,3,0,3,5,4,0,4,5 или 5,0 мг/кг dsRNA. Согласно некоторым вариантам осуществления липидный состав, например, состав LNP, вводят внутривенно.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят путем внутривенной инфузии в течение определенного периода времени, как, например, в течение периода 5, 10, 15, 20 или 25 мин.

Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA находится в форме конъюгата GalNAc, описанного в данном документе. Согласно некоторым таким вариантам осуществления терапевтическое количество может составлять 0.5-50 мг, например, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9

Согласно некоторым вариантам осуществления введение повторяют, например, регулярно, как, например, ежедневно, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После осуществления схемы первичного лечения лекарственные препараты можно вводить менее часто. Например, после введения раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе iRNA вводят двумя или более дозами. Согласно некоторым вариантам осуществления число или величина последующих доз зависят от достижения необходимого эффекта, например, подавления гена ALAS, снижения уровня порфирина или предшественника порфирина (например, ALA и/или PBG), или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, снижения или предупреждения одного или нескольких симптомов, ассциированных с порфирией (например, болевых ощущений, например, нейропатической боли), и/или

предупреждения приступов или снижения частоты и/или тяжести приступов, ассоциированных с порфирией.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе iRNA вводят в соответствии со схемой. Например, средство на основе iRNA можно вводить раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления схема предусматривает введения с равными интервалами, например, ежечасно, каждые четыре часа, каждые шесть часов, каждые восемь часов, каждые двенадцать часов, ежедневно, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, еженедельно, раз в две недели или раз в месяц. Согласно вариантам осуществления средство на основе iRNA вводят еженедельно или раз в две недели для достижения необходимого эффекта, например, снижения уровня ALA и/или PBG, уменьшения болевых ощущений и/или предупреждения острых приступов.

Согласно вариантам осуществления схема предусматривает введения с небольшими интервалами с последующим более длительным периодом времени, в течение которого средство не вводят. Например, схема может предусматривать первоначальный набор доз, которые вводят за относительно короткий период времени (например, приблизительно каждые 6 ч, приблизительно каждые 12 ч, приблизительно каждые 24 ч, приблизительно каждые 48 ч или приблизительно каждые 72 ч) с последующим более длительным периодом времени (например, приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5 приблизительно 6 н приблизительно 7 или приблизительно 8 недель), в течение которого средство на основе iRNA не вводят. Согласно одному варианту осуществления средство на основе iRNA первоначально вводят ежечасно, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, ежедневно, еженедельно, раз в две недели или раз в месяц). Согласно другому варианту осуществления средство на основе iRNA первоначально вводят ежедневно, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, еженедельно, раз в две недели или раз в месяц). Согласно определенным вариантам осуществления более длительный интервал увеличивается со временем, или его определяют на основе достижения необходимого эффекта. Согласно конкретному варианту осуществления средство на основе iRNA вводят один раз в день в течение острого приступа с последующим еженедельным введением доз, начиная с восьмого дня введения. Согласно другому конкретному варианту осуществления средство на основе iRNA вводят через день в течение первой недели с последующим еженедельным введением доз, начиная с восьмого дня введения.

Согласно одному варианту осуществления средство на основе iRNA вводят для предупреждения или снижения тяжести или частоты рецидивирующих приступов, например циклических приступов, ассоциированных с провоцирующим фактором. Согласно некоторым вариантам осуществления провоцирующим фактором является менструальный цикл. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят периодически, например, через равные промежутки для предупреждения или снижения тяжести или частоты рецидивирующих приступов, например, циклических приступов, ассоциированных с провоцирующим фактором, например, менструальным циклом, например, определенной фазой менструального цикла, например, лютеиновой фазой. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят во время определенной фазы менструального цикла или на основе уровней гормонов у пациента, получающего лечение (например, на основе уровней гормонов, которые ассоциированы с определенной фазой менструального цикла). Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят в один или несколько определенных дней менструального цикла, например, в 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й, 7-й, 8-й, 9-й, 10-й, 11-й, 12-й, 13-й, 14-й, 15-й, 16-й, 17-й, 18-й, 19-й, 20-й, 21-й, 22-й, 23-й, 24-й, 25-й, 26-й, 27-й день или в 28-й день (или более поздний день для субъектов, которые имеют более длинный менструальный цикл). Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят во время лютеиновой фазы, например, в один или несколько дней между 14-м - 28-м днями менструального цикла (или позже у субъектов, которые имеют менструальный цикл, который составляет более 28 дней). Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта оценивают время наступления овуляции (например, с помощью анализа крови или мочи, который определяет гормон, ассоциированный с овуляцией, например, LH) и iRNA вводят через заранее определенный интервал после овуляции. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят непосредственно после овуляции. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 дней после овуляции. Любую из этих схем необязательно можно повторять в течение одного или нескольких циклов. Число циклов может зависеть от достижения необходимого эффекта, например подавления гена ALAS1 и/или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, снижения или предупреждения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, снижения частоты приступов, ассоциированных с порфирией.

Согласно некоторым вариантам осуществления вводят первоначальную дозу средства на основе iRNA и проверяют уровень ALA или PBG, например через 1-48 ч, например 2, 4, 8, 12 или 24 ч, после введения первоначальной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления, если уровень ALA и/или PBG снизился (например, с достижением заранее определенного снижения, например, нормализации), и/или если симптомы, ассоциированные с порфирией (например, болевые ощущения), улучшились (например, так что у пациента не наблюдаются симптомы), дальнейшую дозу не вводят, в то же время, если

уровень ALA и/или PBG не снизился (например, не достиг заранее определенного снижения, например, не нормализовался), то дальнейшую дозу ALA или PBG вводят. Согласно некоторым вариантам осуществления дальнейшую дозу вводят через 12, 24, 36, 48, 60 или 72 ч после первоначальной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления, если первоначальная доза не является эффективной в снижении уровня ALA и/или PBG, то дальнейшую дозу модифицируют, например повышают, для достижения необходимого понижения (например, заранее определенного снижения, например, нормализации) уровней ALA или PBG.

Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой понижение по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50%. Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение, которое является эффективным в предупреждении или облегчении симптомов, например, болевых ощущений, продромальных симптомов, или рецидивирующих приступов.

Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение по меньшей мере на 1, 2, 3 или более стандартных отклонений, где стандартное отклонение определяют на основе значений из эталонной выборки, например, эталонной выборки, описанной в данном документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления заранее определенное снижение представляет собой снижение, которое доводит уровень порфирина или предшественника порфирина до уровня, который меньше нормального значения, или до уровня, который меньше или равен нормальному значению (например, нормальному значению, описанному в данном документе).

Используемое в данном документе выражение "нормализация" уровней ALA или PBG (или "нормальный" или "нормализованный" уровень) относится к уровню (например, уровню в моче и/или плазме) либо ALA, либо PBG, либо обоих, который находится в пределах ожидаемого диапазона для здорового индивида, индивида, у который не наблюдаются симптомы (например, индивида, который не испытывает болевых ощущений и/или не страдает нейропатией), или индивида, который не имеет мутации, ассоциированной с порфирией. Например, согласно некоторым вариантам осуществления нормализованный уровень находится в пределах двух стандартных отклонений от нормального среднего. Согласно некоторым вариантам осуществления нормализованный уровень находится в пределах нормального диапазона значений, например, в пределах 95% доверительного интервала для соответствующей контрольной выборки, например, выборки здоровых индивидов или индивидов, которые не имеют генной мутации, ассоциированной с порфирией. Согласно некоторым вариантам осуществления уровень ALA и/или PBG у субъекта (например, уровень ALA и/или PBG в плазме и/или крови) отслеживают через определенные промежутки времени, при этом дальнейшую дозу средства на основе iRNA вводят, если уровень повышается выше нормального значения.

Введение iRNA может снижать уровни mRNA или белка ALAS1, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80 % или по меньшей мере на 90% или более. Введение iRNA может снижать уровни продуктов, ассоциированных с экспрессией гена ALAS1, например, уровни одного или нескольких порфиринов или предшественников порфиринов (например, уровень ALA и/или PBG). Введение средства на основе iRNA также может ингибировать или предупреждать повышение уровней mRNA или белка ALAS1 во время острого приступа AIP.

Перед введением полной дозы iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% инфузионную дозу, и отслеживать у них побочные эффекты, такие как аллергическая реакция, или повышенные уровни липидов или кровяного давления.

Согласно другому варианту осуществления у пациента можно отслеживать нежелательные эффекты.

### Способы модулирования экспрессии гена ALAS1

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении представлен способ модулирования (например, ингибирования или активации) экспрессии гена ALAS1, например, в клетке или у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится ех vivo, in vitro или in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой эритроидную клетку или гепатоцит. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится внутри субъекта (например, млекопитающего, такого как, например, человек). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект (например, человек) подвержен риску заболевания, связанного с экспрессией ALAS1, или у него диагностировано такое заболевание, как описано выше.

Согласно одному варианту осуществления способ включает приведение клетки в контакт с iRNA, описанной в данном документе, в количестве, эффективном для снижения экспрессии гена ALAS1 в клетке. Используемое в данном документе выражение "приведение в контакт" включает непосредственное приведение клетки в контакт, а также опосредованное приведение клетки в контакт. Например, клетка внутри субъекта (например, эритроидная клетка или клетка печени, такая как гепатоцит) может быть

приведена в контакт, когда композицию, содержащую iRNA, вводят (например, внутривенно или подкожно) субъекту.

Экспрессию гена ALAS1 можно оценивать на основе уровня экспрессии mRNA ALAS1, белка ALAS1 или уровня показателя, функционально связанного с уровнем экспрессии гена ALAS1 (например, уровня порфирина или частоты или тяжести симптома, связанного с порфирией). Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессия ALAS1 ингибируется по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Согласно некоторым вариантам осуществления iRNA характеризуется  $IC_{50}$  В диапазоне 0,001-0,01 нМ, 0,001-0,10 нМ, 0,001-1,0 нМ, 0,001-10 нМ, 0,01-0,05 нМ, 0,02-0,60 нМ, 0,01-1,0 нМ, 0,01-1,5 нМ, 0,01-10 нМ. Значение  $IC_{50}$  может быть нормализовано относительно соответствующего контрольного значения, например,  $IC_{50}$  нецелевой iRNA.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение в клетку iRNA, описанной в данном документе, и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения mRNA-транскрипта гена ALAS1, вследствие чего ингибирования экспрессии гена ALAS1 в клетке.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает введение композиции, описанной в данном документе, например, композиции, содержащей iRNA, которая нацеливается на ALAS1, млекопитающему так, что экспрессия целевого гена ALAS1 понижается, например, на протяжении длительного периода времени, например, по меньшей мере двух, трех, четырех дней или более, например, одной недели, двух недель, трех недель или четырех недель или дольше. Согласно некоторым вариантам осуществления понижение экспрессии ALAS1 можно выявлять в течение 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч или 24 ч после первого введения.

Согласно другому варианту осуществления способ предусматривает введение композиции, описанной в данном документе, млекопитающему так, что экспрессия целевого гена ALAS1 повышается, например, по меньшей мере на 10% по сравнению с необработанным животным. Согласно некоторым вариантам осуществления активация ALAS1 наблюдается на протяжении длительного периода времени, например, по меньшей мере двух, трех, четырех дней или более, например, одной недели, двух недель, трех недель, четырех недель или более. Не желая быть связанными теорией, iRNA может активировать экспрессию ALAS1 путем стабилизации mRNA-транскрипта ALAS1, взаимодействия с промотором в геноме и/или подавления ингибитора экспрессии ALAS1.

iRNA, применимые для способов и композиций, описанных в настоящем изобретении, специфично нацелены на PHK (первичные или процессированные) гена ALAS1. Композиции для ингибирования экспрессии гена ALAS1 с использованием iRNA можно получать, а способы такого ингибирования можно осуществлять, как описано в другой части данного документа.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает введение композиции, содержащей iRNA, где iRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части PHK-транскрипта гена ALAS1 млекопитающего, который подлежит лечению. Если организм, который подлежит лечению, представляет собой млекопитающего, такого как человек, то композицию можно вводить любым способом, известным из уровня техники, в том числе без ограничения с помощью перорального, внутрибрюшинного или парентерального пути введения, в том числе с помощью интракраниального (например, интравентрикулярного, интрапаренхиматозного и интратекального), внутривенного, внутримышечного, подкожного, трансдермального, воздушного (аэрозольного), назального, ректального и местного (в том числе буккального и сублингвального) введения.

Согласно определенным вариантам осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. Согласно некоторым таким вариантам осуществления композиции содержат siRNA, находящуюся в липидном составе (например, в составе LNP, таком как состав LNP11) для внутривенной инфузии. Согласно определенным вариантам осуществления такие композиции можно применять для лечения острых приступов порфирии и/или для профилактики (например, для снижения тяжести или частоты приступов).

Согласно другим вариантам осуществления композиции вводят подкожно. Согласно некоторым таким вариантам осуществления композиции содержат iRNA, конъюгированную с лигандом GalNAc. Согласно определенным вариантам осуществления такие композиции можно применять для лечения острых приступов порфирии или для профилактики (например, для снижения тяжести или частоты приступов).

## Способы снижения уровня порфирина или предшественника порфирина

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении представлен способ снижения уровня порфирина или предшественника порфирина, например, в клетке или у субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится ex vivo, in vitro или in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой эритроидную клетку или гепато-

цит. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой гепатоцит. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится внутри субъекта (например, млекопитающего, такого как, например, человек).

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект (например, человек) подвержен риску развития порфирии или у него диагностирована порфирия, как описано в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления способ является эффективным для лечения порфирии, как описано в данном документе (например, путем облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, снижения частоты приступов, ассоциированных с порфирией, снижения вероятности того, что приступ, состоящий из одного или нескольких симптомов, ассоциированных с порфирией, будет возникать при воздействии провоцирующего фактора, и/или снижения риска развития состояний, ассоциированных с порфирией (например, нейропатии (например, прогрессирующей нейропатии), гепатоцеллюлярного рака). Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает приведение клетки в контакт с RNAi, как описано в данном документе, в количестве, достаточном для снижения уровня порфирина или предшественника порфирина (например, ALA или PBG) в клетке, или в другой соответствующей клетке или группе клеток, или у субъекта. Используемое в данном документе выражение "приведение в контакт" включает непосредственное приведение клетки в контакт, а также опосредованное приведение клетки в контакт. Например, клетка внутри субъекта (например, эритроидная клетка или клетка печени, такая как гепатоцит) может быть приведена в контакт, когда композицию, содержащую RNAi, вводят (например, внутривенно или подкожно) субъекту. Используемое в данном документе выражение "другая соответствующая клетка или группа клеток" включает любую клетку или группу клеток, в которых уровень порфирина или предшественника порфирина снижается в результате приведения в контакт. Например, клетка может быть частью ткани, находящейся внутри субъекта (например, клеткой печени, находящейся внутри субъекта), и приведение в контакт клетки внутри субъекта (например, приведение в контакт одной или нескольких клеток печени, находящихся внутри субъекта) с RNAi может приводить к снижению уровня порфирина или предшественника порфирина в другой соответствующей клетке или группе клеток (например, нервных клетках субъекта), или в ткани или жидкости субъекта (например, в моче, крови, плазме или спинномозговой жидкости субъекта).

Согласно некоторым вариантам осуществления порфирин или предшественник порфирина выбирается из группы, состоящей из δ-аминолевулиновой кислоты (ALA), порфобилиногена (PBG), гидкросиметилбилана (HMB), уропорфиногена III, копропорфиногена III, протопорфиногена IX и протопорфирина IX. Согласно некоторым вариантам осуществления предшественник порфирина представляет собой ALA. Согласно некоторым вариантам осуществления предшественник порфирина представляет собой PBG. Согласно некоторым вариантам осуществления способ снижает уровень ALA и PBG. Уровень порфирина или предшественника порфирина можно измерять, как описано в данном документе и как известно из уровня техники.

## Анализы и способы отслеживания активности RNAi

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении представлены анализы и способы отслеживания уровней mRNA ALAS 1. Активность RNAi в печени можно отслеживать с помощью определения уровней mRNA или продукта 5'RACE в ткани, или с помощью определения уровня секретируемого белка в крови.

Альтернативно или в комбинации, можно определять уровни циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1, например, при помощи анализов cERD (Circulating Extracellular RNA Detection). Согласно некоторым вариантам осуществления уровень mRNA ALAS1 можно определять в образце биологической жидкости, например образце сыворотки или мочи. Согласно некоторым вариантам осуществления в биологические жидкости из различных типов клеток выделяются экзосомы, которые содержат mRNA и miRNA, происходящие из исходной ткани. Такие экзосомы можно использовать для отслеживания уровня циркулирующей RNAi. Согласно одному варианту осуществления образец, например, образец сыворотки или мочи от субъекта, получающего лечение посредством iRNA, описанной в данном документе, может быть очищен при помощи низкоскоростного центрифугирования, затем при помощи центрифугирования со скоростью приблизительно 160000g в течение приблизительно 2 ч с образованием осадка. RNA можно экстрагировать и анализировать для измерения уровней mRNA ALAS1. Иллюстративные способы и анализы раскрыты в PCT/US 2012/043584, опубликованном как WO 2012/177906, содержание которых включено при помощи ссылки.

Соответственно, представлен анализ или способ определения уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта. Анализ или способ предусматривают получение PHK (например, внеклеточной PHK) из образца биологической жидкости (например, образца мочи, крови или плазмы) от субъекта, при этом упомянутый образец биологической жидкости содержит mRNA ALAS1; и определение в образце уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1.

Согласно одному варианту осуществления анализ или способ предусматривают стадию получения cDNA ALAS1 из mRNA ALAS1; и приведения в контакт cDNA ALAS1 с нуклеиновой кислотой (например, зондом и/или праймером), комплементарной cDNA ALAS1 или ее части, что тем самым приводит к образованию реакционной смеси; и определения (например, измерения) уровня cDNA ALAS1 в реакци-

онной смеси, где уровень cDNA ALAS1 является показателем уровня mRNA ALAS1, тем самым анализируют уровень циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта.

Согласно одному варианту осуществления анализ или способ предусматривают получение образца биологической жидкости от субъекта, где биологический образец отделяют от ткани и где биологический образец содержит экзосомы. Анализ или способ могут дополнительно предусматривать определение уровней РНК в биологическом образце, где РНК экспрессируется за счет гена в ткани субъекта, где экзосомы не очищают от биологического образца перед определением уровней РНК в биологическом образце.

Согласно вариантам осуществления упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец крови. Согласно вариантам осуществления упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец сыворотки. Согласно другому варианту осуществления упомянутый образец биологической жидкости представляет собой образец мочи.

Согласно вариантам осуществления способ включает PCR, qPCR или 5'-RACE.

Согласно вариантам осуществления упомянутая нуклеиновая кислота представляет собой зонд или праймер.

Согласно вариантам осуществления упомянутая нуклеиновая кислота содержит выявляемый фрагмент и уровень mRNA ALAS1 определяют по выявлению количества выявляемого фрагмента.

Согласно вариантам осуществления упомянутый способ дополнительно предусматривает получение образца биологической жидкости от субъекта.

Согласно вариантам осуществления этих способов эффективность лечения порфирии оценивают на основе сравнения уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта по отношению к нормальному значению.

Согласно вариантам осуществления снижение уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта в ответ на лечение порфирии относительно нормального значения указывает на то, что лечение порфирии является эффективным. Согласно вариантам осуществления нормальное значение представляет собой уровень циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта до лечения порфирии.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или исследовании iRNA и способов, описанных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, которые упоминаются в данном документе, включены при помощи ссылки во всей своей полноте. В случае противоречия настоящее описание, в том числе определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

## Примеры

#### Пример 1. Синтез siRNA

## Источник реагентов

Если источник реагента конкретным образом не указан в данном документе, такой реагент может быть получен от любого поставщика реагентов для целей использования в молекулярной биологии в количестве/с чистотой, стандартными для применения в молекулярной биологии.

## Синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды синтезировали на синтезаторе АКТAoligopilot. Для синтеза олигонуклеотидов применяли коммерчески доступную твердую подложку из стекла с контролируемым размером пор (dT-CPG, 500 Å, Prime Synthesis) и РНК-фосфорамидиты со стандартными защитными группами, 5'-Одиметокситритил-N6-бензоил-2'-трет-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5-О-диметокситритил-N4-ацетил-2'-трет-бутилдиметилсилил-цитидин-3'-О-N,N'-5'-О-диметилокситритил-N2-изобутрил-2'-трет-бутилдимедиизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, тилсилил-гуанозин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-третбутилдиметилсилил-уридин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит (Pierce Nucleic Acids Technologies). 2'-F-фосфорамидиты, 5'-О-диметокситритил-N4-ацетил-2'-фтор-цитидин-3'-О-N,N'диизопропил-2-цианоэтил-фосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-фторуридин-3'-О-N,N'-диизопропил-2-цианоэтил-фосфорамидит приобретали у Promega. Все фосфорамидиты применяли в концентрации 0,2 М в ацетонитриле (СН<sub>3</sub>СN), за исключением гуанозина, который применяли в концентрации 0,2 М в 10% ТНГ/АNС (объем/объем). Время связывания/рециркуляции составляло 16 мин. Активатор представляет собой 5-этилтиотетразол (0,75 M, American International Chemicals); для РО-окисления применяли йод/воду/пиридин, а для PS-окисления применяли PADS (2%) в смеси 2,6-лутидин/ACN (1:1 объ-

3'-Лиганд-конъюгированные нити синтезировали с помощью твердой подложки, содержащей соответствующий лиганд. Например, введение единицы холестерина в последовательность выполняли от фосфорамидита гидроксипролинол-холестерина. Холестерин привязывали к транс-4-гидроксипролинолу с помощью 6-аминогексаноатной связи с получением фрагмента, представляющего собой гидроксипро-

линол-холестерин. iRNA, меченые на 5'-конце Cy-3 и Cy-5.5 (флуорофором), синтезировали из соответствующего фосфорамидита Quasar-570 (Cy-3), приобретенного у Biosearch Technologies. Конъюгацию лигандов с 5'-концом и/или внутренним положением достигали с помощью соответствующим образом защищенного лиганд-фосфорамидитного строительного блока. В течение 15 мин дополнительно выполняли связывание 0,1 М раствора фосфорамидита в безводном CH<sub>3</sub>CN в присутствии активатора 5-(этилтио)-1H-тетразола со связанным с твердой подложкой олигонуклеотидом. Окисление межнуклеотидного фосфита до фосфата выполняли с использованием стандартной смеси йод-вода, которая описана (1), или путем обработки смесью трет-бутилгидропероксида/ацетонитрила/воды (10: 87: 3) с коньюгированным олигонуклеотидом при времени задержки окисления 10 мин. Фосфоротиоат вводили с помощью окисления фосфита до фосфоротиоата с использованием реагента для переноса серы, такого как DDTT (приобретенного у АМ Chemicals), PADS и/или реагента Бокажа. Холестерин-фосфорамидит синтезировали своими силами и использовали в концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время связывания для холестерин-фосфорамидита составляло 16 мин.

## Снятие защиты I (снятие защиты с нуклеотидного основания)

После завершения синтеза подложку переносили в 100 мл стеклянный флакон (VWR). Олигонуклеотид отделяли от подложки с одновременным снятием защиты с основных и фосфатных групп с использованием 80 мл смеси этанольного аммиака [аммиак:этанол (3:1)] в течение 6,5 ч при 55°С. Флакон быстро охлаждали на льду и затем смесь этанольного аммиака фильтровали в новый 250-мл флакон. СРG промывали с помощью  $2 \times 40$  мл частей смеси этанола/воды (1:1 объем/объем). Объем смеси затем сокращали до ~30 мл при помощи роторного испарителя. Затем смесь замораживали на сухом льду и сущили в условиях вакуума на скоростной вакуумной установке.

### Снятие защиты II (удаление группы 2'-TBDMS)

Высушенный остаток ресуспендировали в 26 мл триэтиламина, триэтиламинтригидрофторида (ТЕА·ЗНF) или смеси пиридина-НF и DMSO (3:4:6) и нагревали при 60°С в течение 90 минут для удаления групп трет-бутилдиметилсилила (ТВDMS) в 2'-положении. Затем реакционную смесь гасили 50 мл 20 мМ ацетата натрия и рН корректировали до 6,5. Олигонуклеотид хранили в холодильнике до очистки.

#### Анализ

Перед очисткой олигонуклеотиды анализировали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), а выбор буфера и колонки зависел от природы последовательности и/или конъюгированного лиганда.

### Очистка при помощи HPLC

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды очищали при помощи препаративной HPLC с обращенной фазой. Неконъюгированные олигонуклеотиды очищали при помощи анионообменной HPLC на колонке TSKgel, полученной своими силами. Буферами являются 20 мМ фосфат натрия (рН 8,5) в 10% CH<sub>3</sub>CN (буфер A) и 20 мМ фосфат натрия (рН 8,5) в 10% CH<sub>3</sub>CN, 1 M NaBr (буфер B). Фракции, содержащие олигонуклеотиды полной длины, объединяли, обессоливали и лиофилизировали. Приблизительно 0,15 OD обессоленных олигонуклеотидов разбавляли в воде до 150 мкл и затем отмеряли пипеткой в специальные виалы для CGE- и LC/MS-анализа. Затем соединения анализировали при помощи LC-ESMS и CGE.

## Получение siRNA

Для общего получения siRNA эквимольрные количества смысловой и антисмысловой нитей нагревали в 1xPBS при 95°C в течение 5 мин и медленно охлаждали до комнатной температуры. Целостность дуплекса подтверждали с помощью HPLC-анализа.

Последовательности нуклеиновых кислот представлены ниже с использованием стандартной номенклатуры и, в частности, сокращений табл. 1.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Будет понятно, что данные мономеры при их присутствии в олигонуклеотиде взаимно связываются с помощью 5'-3'-фосфодиэфирных связей.

Сокращение	Нуклеотид(ы)/Нуклеозиды
A	аденозин-3'-фосфат, 2'-дезокси-2'-фторуридин-5'-фосфат или
	аденозин
Ab	бета-L-аденозин-3`-фосфат, бета-L-аденозин-5`-фосфат или
	бета-L-аденозин

# 036477

Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфоротиоат 2'-дезокси-2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-дезокси-2'-
AI	2 -дезокси-2 -фтораденозин-3 -фосфат, 2 -дезокси-2 - фтораденозин-5'-фосфат или 2'-дезокси-2'-фтораденозин
Afs	2'-дезокси-2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат, цитидин-5'-фосфат или цитидин
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат или бета-L-цитидин
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cf	2'-дезокси-2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-дезокси-2'-
GC.	фторцитидин-5'-фосфат или 2'-дезокси-2'-фторцитидин
Cfs	2'-дезокси-2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат или 2'-О-гексадецил- цитидин
(Chds)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат, гуанозин-5'-фосфат или гуанозин
Gb	бета-L-гуанозин-3`-фосфат, бета-L-гуанозин-5`-фосфат или бета-L-гуанозин
Gbs	бета-L-гуанозин-3`-фосфоротиоат
Gf	2'-дезокси-2'-фторгуанозин-3'-фосфат, 2'-дезокси-2'- фторгуанозин-5'-фосфат или 2'-дезокси-2'-фторгуанозин
Gfs	2'-дезокси-2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
Т	5'-метилуридин-3'-фосфат, 5'-метилуридин-5'-фосфат или 5'- метилуридин
Tb	бета-L-тимидин-3'-фосфат, бета-L-тимидин-5'-фосфат или бета- L-тимидин
Tbs	бета-L-тимидин-3'-фосфоротиоат
Tf	2'-дезокси-2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат, 2'-дезокси-2'- фтор-5-метилуридин-3'-фосфат или 2'-дезокси-2'-фтор-5- метилуридин
Tfs	2'-дезокси-2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	уридин-3'-фосфат, уридин-5'-фосфат или уридин
Ub	бета-L-уридин-3`-фосфат, бета-L-уридин-5`-фосфат или бета-L- уридин
Ubs	бета-L-уридин-3`-фосфоротиоат
Uf	2'-дезокси-2'-фторуридин-3'-фосфат, 2'-дезокси-2'-фторуридин или 2'-дезокси-2'-фторуридин-3'-фосфат

# 036477

Ufs	2'-дезокси-2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат, 2'-О-гексадецил-уридин-6'- фосфат или 2'-О-гексадецил-уридин
(Uhds)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метиладенозин-5'-фосфат или 2'-О-метиладенозин
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
С	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-5'-фосфат или 2'-О-метилцитидин
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-5'-фосфат или 2'-О-метилгуанозин
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат, 2'-О-метил-5- метилуридин-5'-фосфат или 2'-О-метил-5-метилуридин
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат, 2'-О-метилуридин-5'-фосфат или 2'-О-метилуридин
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
dA	2`-дезоксиаденозин-3`-фосфат, 2`-дезоксиаденозин-5`-фосфат или 2'-дезоксиаденозин
dAs	2`-дезоксиаденозин-3`-фосфоротиоат
dC	2`-дезоксицитидин-3`-фосфат, 2`-дезоксицитидин-5`-фосфат или 2`-дезоксицитидин
dCs	2`-дезоксицитидин-3`-фосфоротиоат
dG	2`-дезоксигуанозин-3`-фосфат, 2`-дезоксигуанозин-5`-фосфат или 2`-дезоксигуанозин
dGs	2`-дезоксигуанозин-3`-фосфоротиоат или 2`-дезоксигуанозин
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат, 2'-дезокситимидин-5'-фосфат или 2'-дезокситимидин
dTs	2`-дезокситимидин-3`-фосфоротиоат
dU	2`-дезоксиуридин-3`-фосфат, 2`-дезоксиуридин-5`-фосфат или 2`-дезоксиуридин
s	фосфоротиоатная связь
L96 <sup>1</sup>	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол- Нур-(GalNAc-алкил)3

(Aeo)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-
	метоксиэтиладенозин-5'-фосфат или 2'-О-метоксиэтиладенозин
(Aeos)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфоротиоат
(Ceo)	2'-О-метоксиэтилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метоксиэтилцитидин-5'-фосфат или 2'-О-метоксиэтилцитидин
(Ceos)	2'-О-метоксиэтилцитидин-3'-фосфоротиоат
(Geo)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат, 2'-О- метоксиэтилгуанозин-5'-фосфат или 2'-О-метоксиэтилгуанозин
(Geos)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфоротиоат
(Teo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат, 2'-О-метоксиэтил- 5-метилуридин-5'-фосфат или 2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин
(Teos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
(m5Ceo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-5'-фосфат или 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин
(m5Ceos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
(Agn)	1-(2,3-дигидроксипропил)аденин-2-фосфат, 1-(2,3- дигидроксипропил)аденин-3-фосфат или 1-(2,3- дигидроксипропил)аденин
(Agns)	1-(2,3-дигидроксипропил)аденин-2-фосфоротиоат
(Cgn)	1-(2,3-дигидроксипропил)цитозин-2-фосфат, 1-(2,3- дигидроксипропил)цитозин-3-фосфат или 1-(2,3- дигидроксипропил)цитозин
(Cgns)	1-(2,3-дигидроксипропил)цитозин-2-фосфоротиоат
(Ggn)	1-(2,3-дигидроксипропил)гуанин-2-фосфат, 1-(2,3- дигидроксипропил)гуанин-3-фосфат или 1-(2,3- дигидроксипропил)гуанин
(Ggns)	1-(2,3-дигидроксипропил)гуанин-2-фосфоротиоат
(Tgn)	1-(2,3-дигидроксипропил)тимин-2-фосфат, 1-(2,3- дигидроксипропил)тимин-3-фосфат или 1-(2,3- дигидроксипропил)тимин
(Tgns)	1-(2,3-дигидроксипропил)тимин-2-фосфоротиоат
(Ugn)	1-(2,3-дигидроксипропил)урацил-2-фосфат, 1-(2,3- дигидроксипропил)урацил-3-фосфат или 1-(2,3- дигидроксипропил)тимин
(Ugns)	1-(2,3-дигидроксипропил)урацил-2-фосфоротиоат

Химическая структура L96 представлена ниже

Пример 2. Конструирование и синтез siRNA ALAS1

# Экспериментальные способы Биоинформатика Транскрипты

Конструирование siRNA выполняли для выявления siRNA, нацеливающихся на транскрипты ALAS1 человека, макака-резуса (Macaca mulatto), мыши и крысы, аннотированные в базе данных генов NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). При конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции эталонных последовательностей в NCBI: человек - NM\_000688.4 (см. фиг. 3), NM\_199166.1; макак-резус - XM\_001090440.2, XM\_001090675.2; мышь - NM\_020559.2; крыса - NM\_024484.2. Вследствие высокого расхождения последовательностей примат/грызун дуплексы siRNA конструировали в нескольких отдельных партиях, в том числе без ограничения партиях, содержащих дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и макака-резуса; только транскриптам человека, макака-резуса, мыши и крысы и только транскриптам мыши и крысы. Большинство дуплексов siR-NA конструировали так, чтобы они были на 100% идентичны приведенному транскрипту человека и транскриптам других видов, рассмотренным в каждой партии конструирования (выше). В некоторых случаях (см. таблицу 8) ошибочные спаривания между дуплексом и целевой mRNA допускались в первом антисмысловом (последнем смысловом) положении, в тех случаях если комплементарной парой оснований антисмысловой нити щелевой mRNA была пара GC или CG. В этих случаях дуплексы конструировали с парами UA или AU в качестве первой антисмысловой:последней смысловой пары. Таким

образом, дуплексы сохраняли комплементарность, но являлись несовпадающими по отношению к мишени (U:C, U:G, A:C или A:G). Восемнадцать из этих дуплексов с "UA-заменами" конструировали как часть набора человек/макак-резус/мышь/крыса (см. дуплексы в табл. 8 с пометками "C19U", "G19U", "C 19A" или "G19A" в столбце положения).

Прогнозирование конструирования, специфичности и эффективности siRNA Прогнозируемую специфичность всех возможных олигомеров из 19 нуклеотидов прогнозировали исходя из каждой последовательности. Затем выбирали кандидатные олигомеры из 19 нуклеотидов, у которых отсутствовали повторы длиннее 7 нуклеотидов. Эти siRNA, 1510 кандидатных человека/макака-резуса, 114 человека/макака-резуса/мыши/крысы и 717 мыши/крысы, использовали при обширных поисках в отношении соответствующих транскриптом (определенные как набор из записей NM\_ и XM\_ в пределах наборов эталонных последовательностей человека, макака-резуса, собаки, мыши или крысы в NCBI) с применением исчерпывающего алгоритма "грубой силы", включенного в скрипт питон "BruteForce.py". Скрипт затем разбирал выравнивания транскрипт-олигомер с получением балла, основанного на положении и количестве ошибочных спариваний между siRNA и любым потенциальным "нецелевым" транскриптом. "Нецелевой" балл взвешивали для усиления различий в "затравочном" участке siRNA в положениях 2-9 с 5'-конца молекулы. Каждой паре олигомер-транскрипт из поиска "грубой силы" присваивали балл для ошибочного спаривания путем суммирования отдельных баллов для ошибочного спаривания; ошибочные спаривания в положениях 2-9 определяли как 2.8, ошибочные спаривания в положениях сайта расщепления 10-11 определяли как 1,2 и ошибочные спаривания в участке 12-19 определяли как 1,0. Дополнительное нецелевое прогнозирование выполняли путем сравнения встречаемости гептамеров и октамеров, полученных из 3 отличных полученных из затравки гексамеров каждого олигомера. Гексамеры из положений 2-7 по отношению к 5'-началу использовали для создания 2 гептамеров и одного октамера. Гептамер1' создавали путем добавления А на 3'-конец гексамера; гептамер2 создавали путем добавления А на 5'-конец гексамера; октамер создавали путем добавления А как на 5'-конец, так и на 3'-конец гексамера. Заранее вычисляли встречаемость октамеров и гептамеров в 3'UTRome человека, макака-резуса, мыши или крысы (определенные как подпоследовательности транскриптом из базы данных эталонных последовательностей в NCBI, где конец кодирующего участка, 'CDS', является четко определенным). Встречаемость октамеров нормализовали по отношению к встречаемости гептамеров с использованием медианного значения из диапазона встречаемостей октамеров. Затем вычисляли 'mirSeedScore' путем вычисления суммы ( (3 X нормализованное подсчитанное число для октамеров ) + ( 2 X подсчитанное число для гептамера2) + (1 X подсчитанное число для гептамера1)).

Обоим нитям siRNA присваивали категорию специфичности согласно рассчитанным баллам: балл выше 3 оценивали как высоко специфичная, равный 3 как специфичная и от 2,2 до 2,8 оценивали как умеренно специфичная. Упорядочивание проводили по специфичности антисмысловой нити. Затем отбирали дуплексы, у антисмысловых олигонуклеотидов которых отсутствовала GC в первом положении, отсутствовал G в обоих положениях 13 и 14 и присутствовали 3 или более Us или As в затравочном участке (характеристики дуплексов с высокой прогнозированной эффективностью).

Кандидатные коньюгированные с GalNAc дуплексы, 21 и 23 нуклеотида в длину для смысловой и антисмысловой нитей соответственно, конструировали путем удлинения антисмысловых олигомеров из 19 нуклеотидов 4 дополнительными нуклеотидами в 3'-направлении (сохраняя полную комплиментарность с целевым транскриптом). Смысловую нить описывали как обратную комплементарную последовательность первых 21 нуклеотида антисмыслового олигомера из 23 нуклеотидов. Выбирали такие дуплексы, которые сохраняли полные соответствия ко всем выбранным транскриптам видов на протяжении всех 23 нуклеотидов.

## Отбор последовательностей siRNA

Синтезировали олигонуклеотиды siRNA из 19 нуклеотидов, являющиеся дуплексами человека/макака-резуса, полученными в общей сложности из 90 смысловых и 90 антисмысловых, человека/макака-резуса/мыши/крысы полученными в общей сложности из 40 смысловых и 40 антисмысловых, и мыши/крысы, полученными в общей сложности из 40 смысловых и 40 антисмысловых, и составляли в дуплексы. Синтезировали олигонуклеотиды из 21/23 нуклеотидов, являющиеся дуплексами человека/макака-резус, полученными в общей сложности из 45 смысловых и 45 антисмысловых, с получением 45 конъюгированных с GalNAc дуплексов.

Последовательности смысловой и антисмысловой нитей модифицированных дуплексов показаны в табл. 2, а последовательности смысловой и антисмысловой нитей немодифицированных дуплексов показаны в табл. 3.

## Синтез последовательностей ALAS1

Последовательности ALAS1 синтезировали на синтезаторе MerMade 192 с масштабом либо 1, либо 0,2 мкмоль. Одиночные нити получали с модификациями 2'О-метила для in vitro скрининга с использованием реагентов для трансфекции. 3'-Конъюгаты GalNAc получали с последовательностями, содержащими модификации 2'F и 2'-О-метила смысловой нити в конструкциях из 21-23 нуклеотидов для свободного захвата в клетках. Для всех последовательностей в перечне из 21 нуклеотида использовали химию 'endolight', подробно описанную ниже.

Все пиримидины (цитозин и уридин) в смысловой нити содержали 2'-О-метиловые основания (2'-О-метил-С и 2'-О-метил-U).

В антисмысловой нити пиримидины, расположенные рядом с (по направлению к 5'-положению) рибунуклеозидом А, замещали их соответствующими 2-О-метил-нуклеозидами.

Вводили удлинение из двух оснований dTsdT на 3'-конце как смысловой, так и антисмысловой последовательностей.

Файл последовательности конвертировали в текстовый файл, чтобы сделать его совместимым для загрузки в компьютерную программу синтеза MerMade 192.

Для конъюгированных с GalNAc смысловых нитей и комплементарных антисмысловых последовательностей 2'F и другие модифицированные нуклеозиды вводили в комбинации с 2'Ометилрибонуклеозидами. Синтез осуществляли на модифицированной GalNAc CPG-подложке для смысловой нити, а для антисмысловой последовательности на CPG, модифицированной универсальной подложке.

## Синтез, расщепление и снятие защиты

В синтезе последовательностей ALAS1 применяли синтез нуклеотидов на твердой подложке с использованием химии фосфорамидитов. Для последовательностей, отвечающих химии "endolight", из 21 нуклеотида в качестве твердой подложки использовали дезокситимидин-CPG, в то время как для конъюгатов GalNAc для смысловой нити использовали твердую подложку GalNAc, а для антисмысловой нити универсальную CPG.

Синтез упомянутых выше последовательностей выполняли с масштабом либо 1, либо 0,2 мкм в 96луночных планшетах. Растворы амидитов получали при концентрации 0,1 M, а этилтиотетразол (0,6 M в ацетонитриле) использовали в качестве активатора.

Синтезированные последовательности расщепляли и снимали защиту в 96-луночных планшетах, используя метиламин на первой стадии и фторидный реагент на второй стадии. Для последовательностей, содержащих GalNAc и 2'F-нуклеозид, условия снятия защиты модифицировали. После расщепления и снятия защиты последовательности осаждали с использованием смеси ацетон: этанол (80:20) и осадок ресуспендировали в 0,2 М натрий-ацетатном буфере. Образцы из каждой последовательности анализировали при помощи LC-MS для подтверждения идентичности, УФ - для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали при помощи IEX-хроматографии для определения чистоты.

### Очистка и обессоливание

Последовательности ALAS1 осаждали и очищали на системе очистки АКТА с использованием колонки с Sephadex. ALAS1 исследовали при температуре окружающей среды. Введение и сбор образца выполняли в 96-луночных (лунка с глубиной 1,8 мл) планшетах. В элюенте собирали один пик, соответствующий последовательности полной длины. Обессоленные последовательности ALAS1 анализировали в отношении концентрации (УФ-измерением при A260) и чистоты (ионообменной хроматографией HPLC). Комплементарные одиночные нити затем объединяли в стехиометрическом соотношении 1:1 с образованием дуплексов siRNA.

Таблица 2. Модифицированные последовательности одиночных нитей и дуплексов ALAS1 человека

SEQ ID	SEQID	Положение	Название	Смысловая	Антисмысловая
NO:	NO:	на	дуплекса	последовательность (5'-3')	последовательность (5'-3')
(смысло	(анти-				
-вая)	смысло -вая)	транскрипте			
	bun,	NM_			
		000688.4			
2	3	522-540	AD-55078.2	cuccGGccAGuGAGAAAGAdTsd	UCUUUCUcACUGGCCGGAGdTs
				T uGGcAGcAcAGAuGAAucAdTsd	dT UGAUUcAUCUGUGCUGCcAdTs
4	5	669-687	AD-55084.2	T	dT
6	7	790-808	AD-55090.2	cAGuGuGGuuAGuGuGAAAdTs dT	UUUcAcACuAACcAcACUGdTsdT
8	9	853-871	AD-55096.2	cAucAuGcAAAAGcAAAGAdTsd T	UCUUUGCUUUUGcAUGAUGdTs dT
10	11	876-894	AD-55102.2	AAAGAGuGucucAucuucudTsd T	AGAAGAUGAGAcACUCUUUdTs dT
12	13	877-895	AD-55106.2	AAGAGuGucucAucuucuudTsd T	AAGAAGAUGAGAcACUCUUdTs dT
14	15	914-932	AD-55111.2	ucuGuuuccAcuuuucAGudTsdT	ACUGAAAAGUGGAAAcAGAdTs dT
16	17	923-941	AD-55073.2	AcuuuucAGuAuGAucGuudTsd T	AACGAUcAuACUGAAAAGUdTsd T
18	19	926-944	AD-55079.2	uuucAGuAuGAucGuuucudTsd T	AGAAACGAUcAuACUGAAAdTsd T
20	21	927-945	AD-55085.2	uucAGuAuGAucGuuucuudTsd T	AAGAAACGAUcAuACUGAAdTsd T
22	23	928-946	AD-55091.2	ucAGuAuGAucGuuucuuudTsd T	AAAGAAACGAUcAuACUGAdTsd T
24	25	932-950	AD-55097.2	uAuGAucGuuucuuuGAGAdTsd T	UCUcAAAGAAACGAUcAuAdTsd T
26	27	973-991	AD-55103.2	uGAccAcAccuAucGAGuudTsdT	AACUCGAuAGGUGUGGUcAdTs dT
28	29	975-993	AD-55107.2	AccAcAccuAucGAGuuuudTsdT	AAAACUCGAuAGGUGUGGUdTs dT
30	31	1029-1047	AD-55112.2	uGGcAGAuGAcuAuucAGAdTsd T	UCUGAAuAGUcAUCUGCcAdTsd T
32	33	1077-1095	AD-55074.2	ucuGGuGcAGuAAuGAcuAdTsd T	uAGUcAUuACUGcACcAGAdTsd T
34	35	1124-1142	AD-55080.2	uGuGGGGcAGuuAuGGAcAdTs dT	UGUCcAuAACUGCCCcAcAdTsdT
36	37	1137-1155	AD-55086.2	uGGAcAcuuuGAAAcAAcAdTsd T	UGUUGUUUcAAAGUGUCcAdTs dT
38	39	1182-1200	AD-55098.2	AuAuuucuGGAAcuAGuAAdTsd T	UuACuAGUUCcAGAAAuAUdTsd T
40	41	1184-1202	AD-55104.2	AuuucuGGAAcuAGuAAAudTsd T	AUUuACuAGUUCcAGAAAUdTsd T

# 036477

42	43	1185-1203	AD-55108.2	uuucuGGAAcuAGuAAAuudTsd T	AAUUuACuAGUUCcAGAAAdTsd T
44	45	1188-1206	AD-55113.2	cuGGAAcuAGuAAAuuccAdTsd T	UGGAAUUuACuAGUUCcAGdTs dT
46	47	1325-1343	AD-55075.2	uGuGAGAuuuAcucuGAuudTsd T	AAUcAGAGuAAAUCUcAcAdTsd T
48	49	1364-1382	AD-55081.2	AuccAAGGGAuucGAAAcAdTsd T	UGUUUCGAAUCCCUUGGAUdTs dT
50	51	1382-1400	AD-55087.2	AGccGAGuGccAAAGuAcAdTsd T	UGuACUUUGGcACUCGGCUdTs dT
52	53	1478-1496	AD-55093.2	uuuGAAAcuGuccAuucAAdTsd T	UUGAAUGGAcAGUUUcAAAdTs dT
54	55	1531-1549	AD-55099.2	uGAuGuGGcccAuGAGuuudTsd T	AAACUcAUGGGCcAcAUcAdTsd T
56	57	1631-1649	AD-53573.3	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsd T	UGUCcAUUUUUGGcAUGACdTs dT
58	59	1637-1655	AD-55109.2	ccAAAAAuGGAcAucAuuudTsd T	AAAUGAUGUCcAUUUUUGGdTs dT
60	61	1706-1724	AD-55114.2	AcGAGuucucuGAuuGAcAdTsd T	UGUcAAUcAGAGAACUCGUdTs dT
62	63	1962-1980	AD-55076.2	AAGucuGuGAuGAAcuAAudTsd T	AUuAGUUcAUcAcAGACUUdTsd T
64	65	1967-1985	AD-55082.2	uGuGAuGAAcuAAuGAGcAdTs dT	UGCUcAUuAGUUcAUcAcAdTsd T
66	67	1977-1995	AD-55088.2	uAAuGAGcAGAcAuAAcAudTsd T	AUGUuAUGUCUGCUcAUuAdTs dT
68	69	2189-2207	AD-55094.2	uuuGAAGuGAuGAGuGAAAdTs dT	UUUcACUcAUcACUUcAAAdTsd T
70	71	2227-2245	AD-55100.2	AGGcuuGAGcAAGuuGGuAdTs dT	uACcAACUUGCUcAAGCCUdTsd T
72	73	2313-2331	AD-55105.2	ucuucAGAGuuGucuuuAudTsd T	AuAAAGAcAACUCUGAAGAdTsd T
74	75	2317-2335	AD-55110.2	cAGAGuuGucuuuAuAuGudTsd T	AcAuAuAAAGAcAACUCUGdTsd T
76	77	2319-2337	AD-55115.2	GAGuuGucuuuAuAuGuGAdTs dT	UcAcAuAuAAAGAcAACUCdTsdT
78	79	2320-2338	AD-55077.2	AGuuGucuuuAuAuGuGAAdTsd T	UUcAcAuAuAAAGAcAACUdTsd T
80	81	2344-2362	AD-55083.2	uuAuAuuAAAuuuuAAucudTsd T	AGAUuAAAAUUuAAuAuAAdTsd T
82	83	2352-2370	AD-55089.2	AAuuuuAAucuAuAGuAAAdTsd T	UUuACuAuAGAUuAAAAUUdTs dT
84	85	2353-2371	AD-55095.2	AuuuuAAucuAuAGuAAAAdTsd T	UUUuACuAuAGAUuAAAAUdTs dT
86	87	2376-2394	AD-55101.2	AGuccuGGAAAuAAAuucudTsd T	AGAAUUuAUUUCcAGGACUdTs dT
88	89	358-376	AD-53511.1	cuGcccAuucuuAucccGAdTsdT	UCGGGAuAAGAAUGGGcAGdTs dT
90	91	789-807	AD-53512.1	ccAGuGuGGuuAGuGuGAAdTs dT	UUcAcACuAACcAcACUGGdTsdT
92	93	1076-1094	AD-53513.1	GucuGGuGcAGuAAuGAcudTsd T	AGUcAUuACUGcACcAGACdTsd T
94	95	1253-1271	AD-53514.1	GcAcucuuGuuuuccucGudTsdT	ACGAGGAAAAcAAGAGUGCdTs dT
96	97	1544-1562	AD-53515.1	GAGuuuGGAGcAAucAccudTsd T	AGGUGAUUGCUCcAAACUCdTs dT

98	99	2228-2246	AD-53516.1	GGcuuGAGcAAGuuGGuAudTs	AuACcAACUUGCUcAAGCCdTsd
100	101	404-422	AD-53517.1	dT GGcAAAucucuGuuGuucudTsd	T AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsd
102	103	404-422	AD-53517.1	T GGcAAAucucuGuuGuucudTsd	T AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsd
104	105	866-884	AD-53518.1	T cAAAGAccAGAAAGAGuGudTs	T AcACUCUUUCUGGUCUUUGdTs
106	107	1080-1098	AD-53519.1	dT GGuGcAGuAAuGAcuAccudTsd	dT AGGuAGUcAUuACUGcACCdTsd
108	109	1258-1276	AD-53520.1	T cuuGuuuuccucGuGcuuudTsdT	T AAAGcACGAGGAAAAcAAGdTsd
110	111	1616-1634	AD-53521.1	GGGGAucGGGAuGGAGucAdTs	T UGACUCcAUCCCGAUCCCCdTsd
112	113	2230-2248	AD-53522.1	dT cuuGAGcAAGuuGGuAucudTsd	T AGAuACcAACUUGCUcAAGdTsd
114	115	436-454	AD-53522.1 AD-53523.1	T ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsd	T AACUUCcAUcAUCUUGGGGdTs
116	117	436-454	AD-53523.1	T ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsd	dT AACUUCcAUcAUCUUGGGGdTs
				T ava A v av v av av A C A v A A d T a d T	dT UuAUCUUGAAGAAGAUGAGdTs
118	119	885-903	AD-53524.1	cucAucuucuucAAGAuAAdTsdT GGGGcAGuuAuGGAcAcuudTs	dT AAGUGUCcAuAACUGCCCCdTsd
120	121	1127-1145	AD-53525.1	dT GAuGccAGGcuGuGAGAuudTs	T AAUCUcAcAGCCUGGcAUCdTsd
122	123	1315-1333	AD-53526.1	dT GAGAcAGAuGcuAAuGGAudTs	T AUCcAUuAGcAUCUGUCUCdTsd
124	125	1870-1888	AD-53527.1	dT	T AuAUGAuAAUGGCCUGGGGdTs
126	127	2286-2304	AD-53528.1	ccccAGGccAuuAucAuAudTsdT	dT UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTs
128	129	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	dT UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTs
130	131	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	dT uACUGAAAAGUGGAAAcAGdTs
132	133	915-933	AD-53530.1	cuGuuuccAcuuuucAGuAdTsdT GGAcAcuuuGAAAcAAcAudTsd	dT  AUGUUGUUUcAAAGUGUCCdTs
134	135	1138-1156	AD-53531.1	Т	dT
136	137	1324-1342	AD-53532.1	cuGuGAGAuuuAcucuGAudTsd	AUCAGAGUAAAUCUcAcAGdTsd
138	139	1927-1945	AD-53533.1	cccuGuGcGGGuuGcAGAudTsd	AUCUGcAACCCGcAcAGGGdTsd T
140	141	2312-2330	AD-53534.1	GucuucAGAGuuGucuuuAdTsd T	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsd T
142	143	646-664	AD-53535.1	cAcuGcAAGcAAAuGcccudTsdT	AGGGcAUUUGCUUGcAGUGdTs dT
144	145	922-940	AD-53536.1	cAcuuuucAGuAuGAucGudTsd T	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTs dT
146	147	1163-1181	AD-53537.1	GGGGcAGGuGGuAcuAGAAdTs dT	UUCuAGuACcACCUGCCCCdTsd T
148	149	1347-1365	AD-53538.1	GGAAccAuGccuccAuGAudTsdT	AUcAUGGAGGcAUGGUUCCdTs dT
150	151	1964-1982	AD-53539.1	GucuGuGAuGAAcuAAuGAdTs dT	UcAUuAGUUcAUcAcAGACdTsd T
152	153	2321-2339	AD-53540.1	GuuGucuuuAuAuGuGAAudTsd T	AUUcAcAuAuAAAGAcAACdTsdT
154	155	671-689	AD-53541.1	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsd T	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTs dT
156	157	924-942	AD-53542.1	cuuuucAGuAuGAucGuuudTsd T	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTsd
158	159	1164-1182	AD-53543.1	GGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTs dT	UUUCuAGuACcACCUGCCCdTsd
160	161	1460-1478	AD-53544.1	GuccccAAGAuuGuGGcAudTsd	AUGCcAcAAUCUUGGGGACdTsd
162	163	1976-1994	AD-53545.1	cuAAuGAGcAGAcAuAAcAdTsd	UGUuAUGUCUGCUcAUuAGdTs dT
164	165	786-804	AD-53546.1	GccccAGuGuGGuuAGuGudTsd	AcACuAACcAcACUGGGGCdTsdT
166	167	935-953	AD-53547.1	GAucGuuucuuuGAGAAAAdTsd	UUUUCUcAAAGAAACGAUCdTs dT
168	169	1165-1183	AD-53548.1	GGcAGGuGGuAcuAGAAAudTs dT	AUUUCuAGuACcACCUGCCdTsd
170	171	1530-1548	AD-53549.1	GuGAuGuGGcccAuGAGuudTsd T	AACUcAUGGGCcAcAUcACdTsdT
172	173	2003-2021	AD-53550.1	cAAGcAAucAAuuAcccuAdTsdT	uAGGGuAAUUGAUUGCUUGdTs dT
174	175	788-806	AD-53551.1	cccAGuGuGGuuAGuGuGAdTsd T	UcAcACuAACcAcACUGGGdTsdT
176	177	974-992	AD-53552.1	GAccAcAccuAucGAGuuudTsdT	AAACUCGAuAGGUGUGGUCdTs dT
178	179	1191-1209	AD-53553.1	GAAcuAGuAAAuuccAuGudTsd	AcAUGGAAUUuACuAGUUCdTs
180	181	1541-1559	AD-53554.1	CAUGAGuuuGGAGcAAucAdTsd	UGAUUGCUCcAAACUcAUGdTs
182	183	2075-2093	AD-53555.1	T ccccAGAuGAuGAAcuAcudTsdT	AGUAGUUCAUCAUCUGGGGdTs
184	185	360-378	AD-53561.1	GcccAuucuuAucccGAGudTsdT	ACUCGGGAuAAGAAUGGGCdTs
186	187	1356-1374	AD-53567.1	ccuccAuGAuccAAGGGAudTsdT	AUCCCUUGGAUcAUGGAGGdTs
188	189	1631-1649	AD-53573.1	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsd	UGUCcAUUUUUGGcAUGACdTs
190	191	1634-1652	AD-53579.1	T AuGccAAAAAuGGAcAucAdTsd	UGAUGUCcAUUUUUGGcAUdTs
		I	I	Т	dT

Таблица 3. Немодифицированные последовательности одиночных нитей и дуплексов ALAS1 человека

SEQ ID NO: (смысло -вая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая )	Положение на транс- крипте NM_ 000688.4	Название дуплекса	СТИ ОДИНОЧНЫХ НИТ  Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
192	193	522-540	AD-55078.2	CUCCGGCCAGUGAGAAAGA	UCUUUCUCACUGGCCGGAG
194	195	669-687	AD-55084.2	UGGCAGCACAGAUGAAUCA	UGAUUCAUCUGUGCUGCCA
196	197	790-808	AD-55090.2	CAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUG
198	199	853-871	AD-55096.2	CAUCAUGCAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAU G
200	201	876-894	AD-55102.2	AAAGAGUGUCUCAUCUUCU	AGAAGAUGAGACACUCUUU
202	203	877-895	AD-55106.2	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU
204	205	914-932	AD-55111.2	UCUGUUUCCACUUUUCAGU	ACUGAAAAGUGGAAACAGA
206	207	923-941	AD-55073.2	ACUUUUCAGUAUGAUCGUU	AACGAUCAUACUGAAAAGU
208	209	926-944	AD-55079.2	UUUCAGUAUGAUCGUUUCU	AGAAACGAUCAUACUGAAA
210	211	927-945	AD-55085.2	UUCAGUAUGAUCGUUUCUU	AAGAAACGAUCAUACUGAA
212	213	928-946	AD-55091.2	UCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGA
214	215	932-950	AD-55097.2	UAUGAUCGUUUCUUUGAGA	UCUCAAAGAAACGAUCAUA
216	217	973-991	AD-55103.2	UGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCA
218	219	975-993	AD-55107.2	ACCACACCUAUCGAGUUUU	AAAACUCGAUAGGUGUGGU
220	221	1029-1047	AD-55112.2	UGGCAGAUGACUAUUCAGA	UCUGAAUAGUCAUCUGCCA
222	223	1077-1095	AD-55074.2	UCUGGUGCAGUAAUGACUA	UAGUCAUUACUGCACCAGA
224	225	1124-1142	AD-55080.2	UGUGGGCAGUUAUGGACA	UGUCCAUAACUGCCCCACA
226	227	1137-1155	AD-55086.2	UGGACACUUUGAAACAACA	UGUUGUUUCAAAGUGUCCA
228	229	1182-1200	AD-55098.2	AUAUUUCUGGAACUAGUAA	UUACUAGUUCCAGAAAUAU
230	231	1184-1202	AD-55104.2	AUUUCUGGAACUAGUAAAU	AUUUACUAGUUCCAGAAAU
232	233	1185-1203	AD-55108.2	UUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUUCCAGAAA
234	235	1188-1206	AD-55113.2	CUGGAACUAGUAAAUUCCA	UGGAAUUUACUAGUUCCAG
236	237	1325-1343	AD-55075.2	UGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACA
238	239	1364-1382	AD-55081.2	AUCCAAGGGAUUCGAAACA	UGUUUCGAAUCCCUUGGAU
240	241	1382-1400	AD-55087.2	AGCCGAGUGCCAAAGUACA	UGUACUUUGGCACUCGGCU
242	243	1478-1496	AD-55093.2	UUUGAAACUGUCCAUUCAA	UUGAAUGGACAGUUUCAAA
244	245	1531-1549	AD-55099.2	UGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCA
246	247	1631-1649	AD-53573.3	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
248	249	1637-1655	AD-55109.2	CCAAAAAUGGACAUCAUUU	AAAUGAUGUCCAUUUUUGG
250	251	1706-1724	AD-55114.2	ACGAGUUCUCUGAUUGACA	UGUCAAUCAGAGAACUCGU
252	253	1962-1980	AD-55076.2	AAGUCUGUGAUGAACUAAU	AUUAGUUCAUCACAGACUU
254	255	1967-1985	AD-55082.2	UGUGAUGAACUAAUGAGCA	UGCUCAUUAGUUCAUCACA
256	257	1977-1995	AD-55088.2	UAAUGAGCAGACAUAACAU	AUGUUAUGUCUGCUCAUUA
258	259	2189-2207	AD-55094.2	UUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAA
260	261	2227-2245	AD-55100.2	AGGCUUGAGCAAGUUGGUA	UACCAACUUGCUCAAGCCU
262	263	2313-2331	AD-55105.2	UCUUCAGAGUUGUCUUUAU	AUAAAGACAACUCUGAAGA
264	265	2317-2335	AD-55110.2	CAGAGUUGUCUUUAUAUGU	ACAUAUAAAGACAACUCUG
266	267	2319-2337	AD-55115.2	GAGUUGUCUUUAUAUGUG A	UCACAUAUAAAGACAACUC
268	269	2320-2338	AD-55077.2	AGUUGUCUUUAUAUGUGA A	UUCACAUAUAAAGACAACU
270	271	2344-2362	AD-55083.2	UUAUAUUAAAUUUUAAUCU	AGAUUAAAAUUUAAUAUAA
272	273	2352-2370	AD-55089.2	AAUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUU
274	275	2353-2371	AD-55095.2	AUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAGAUUAAAAU

1 276	277	2376-2394	AD-55101.2	AGUCCUGGAAAUAAAUUCU	
276	277	358-376	AD-53101.2 AD-53511.1	CUGCCCAUUCUUAUCCCGA	AGAAUUUAUUUCCAGGACU
278	279	789-807	AD-53511.1 AD-53512.1	CCAGUGUGGUUAGUGUGAA	UCGGGAUAAGAAUGGGCAG
280	281	1076-1094	AD-53513.1	GUCUGGUGCAGUAAUGACU	UUCACACUAACCACACUGG
282	283	1253-1271	AD-53513.1 AD-53514.1	GCACUCUUGUUUUCCUCGU	AGUCAUUACUGCACCAGAC
284	285	1544-1562	AD-53515.1	GAGUUUGGAGCAAUCACCU	ACGAGGAAAACAAGAGUGC
286	287	2228-2246	AD-53515.1 AD-53516.1	GGCUUGAGCAAGUUGGUAU	AGGUGAUUGCUCCAAACUC
288	289	404-422	AD-53510.1 AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AUACCAACUUGCUCAAGCC
290	291	404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAACAGAGAUUUGCC AGAACAACAGAGAUUUGCC
292	293	866-884	AD-53518.1	CAAAGACCAGAAAGAGUGU	ACACUCUUUCUGGUCUUUG
296	297	1080-1098	AD-53519.1	GGUGCAGUAAUGACUACCU	
298	299	1258-1276	AD-53520.1	cuuguuuuccucgugcuuu	AGGUAGUCAUUACUGCACC
300		1616-1634	AD-53521.1	GGGGAUCGGGAUGGAGUCA	AAAGCACGAGGAAAACAAG
	301	2230-2248	AD-53522.1	CUUGAGCAAGUUGGUAUCU	UGACUCCAUCCCGAUCCCC
302	303	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AGAUACCAACUUGCUCAAG
304	305	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
306	307	885-903	AD-53524.1	CUCAUCUUCUUCAAGAUAA	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
308	309	1127-1145	AD-53525.1	GGGCAGUUAUGGACACUU	UUAUCUUGAAGAAGAUGAG AAGUGUCCAUAACUGCCCC
310	311	1315-1333	AD-53525.1 AD-53526.1	GAUGCCAGGCUGUGAGAUU	
312	313	1870-1888	AD-53520.1 AD-53527.1	GAGACAGAUGCUAAUGGAU	AAUCUCACAGCCUGGCAUC
314	315	2286-2304	AD-53527.1 AD-53528.1	CCCCAGGCCAUUAUCAUAU	AUCCAUUAGCAUCUGUCUC
316	317				AUAUGAUAAUGGCCUGGGG UGUUGGUAGUGUACUGCU
318	319	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	G
320	321	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCU G
322	323	915-933	AD-53530.1	CUGUUUCCACUUUUCAGUA	UACUGAAAAGUGGAAACAG
324	325	1138-1156	AD-53531.1	GGACACUUUGAAACAACAU	AUGUUGUUUCAAAGUGUCC
326	327	1324-1342	AD-53532.1	CUGUGAGAUUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUCUCACAG
328	329	1927-1945	AD-53533.1	CCCUGUGCGGGUUGCAGAU	AUCUGCAACCCGCACAGGG
330	331	2312-2330	AD-53534.1	GUCUUCAGAGUUGUCUUUA	UAAAGACAACUCUGAAGAC
332	333	646-664	AD-53535.1	CACUGCAAGCAAAUGCCCU	AGGGCAUUUGCUUGCAGUG
334	335	922-940	AD-53536.1	CACUUUUCAGUAUGAUCGU	ACGAUCAUACUGAAAAGUG
336	337	1163-1181	AD-53537.1	GGGGCAGGUGGUACUAGAA	UUCUAGUACCACCUGCCCC
338	339	1347-1365	AD-53538.1	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
340	341	1964-1982	AD-53539.1	GUCUGUGAUGAACUAAUGA	UCAUUAGUUCAUCACAGAC
342	343	2321-2339	AD-53540.1	GUUGUCUUUAUAUGUGAA	AUUCACAUAUAAAGACAAC
344	345	671-689	AD-53541.1	GCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGC
346	347	924-942	AD-53542.1	CUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAG
348	349	1164-1182	AD-53543.1	GGGCAGGUGGUACUAGAAA	UUUCUAGUACCACCUGCCC
350	351	1460-1478	AD-53544.1	GUCCCCAAGAUUGUGGCAU	AUGCCACAAUCUUGGGGAC
352	353	1976-1994	AD-53545.1	CUAAUGAGCAGACAUAACA	UGUUAUGUCUGCUCAUUAG
354	355	786-804	AD-53546.1	GCCCCAGUGUGGUUAGUGU	ACACUAACCACACUGGGGC
356	357	935-953	AD-53547.1	GAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAGAAACGAUC
358	359	1165-1183	AD-53548.1	GGCAGGUGGUACUAGAAAU	AUUUCUAGUACCACCUGCC
360	361	1530-1548	AD-53549.1	GUGAUGUGGCCCAUGAGUU	AACUCAUGGGCCACAUCAC
		2003-2021	AD-53550.1	CAAGCAAUCAAUUACCCUA	UAGGGUAAUUGAUUGCUU
362	363	788-806			G
364	365	974-992	AD-53551.1 AD-53552.1	GACCACACCUAUCGAGUUU	UCACACUAACCACACUGGG
366	367	1191-1209	AD-53552.1 AD-53553.1	GAACUAGUAAAUUCCAUGU	AAACUCGAUAGGUGUGGUC
368	369	1541-1559	AD-53555.1 AD-53554.1	CAUGAGUUUGGAGCAAUCA	ACAUGGAAUUUACUAGUUC
370 372	371 373	2075-2093	AD-53554.1 AD-53555.1	CCCCAGAUGAUGAACUACU	UGAUUGCUCCAAACUCAUG AGUAGUUCAUCAUCUGGGG
374	375	360-378	AD-53561.1	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC
376	377	1356-1374	AD-53567.1	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
378	379	1631-1649	AD-53573.1	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
380	381	1634-1652	AD-53579.1	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU
200	201	1	1		L

Пример 3. In vitro скрининг дуплексов siRNA ALAS1 в отношении нокдауна активности ALAS1. Дуплексы siRNA ALAS1 подвергали скринингу в отношении способности снижать экспрессию ALAS1 in vitro.

# In vitro скрининг Клеточная культура и трансфекции

Клетки Hep3B (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при  $37^{\circ}$ С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в MEM (ATCC), дополненной 10% FBS, до отделения от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 96-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. 80 мкл

полных питательных сред, содержащих  $\sim 2 \times 10^4$  клеток Hep3B, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение либо 24 либо 120 ч перед очисткой PHK. Эксперименты с использованием разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперименты в отношении зависимости эффекта от дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10, 1,67, 0,27, 0,046, 0,0077, 0,0013, 0,00021, 0,00004 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора "DYNABEADS mRNA Isolation Kit" (Invitrogen, № по кат. 610-12)

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем смешивали в течение 5 мин при 850 об./мин с помощью Ерреndorf Thermomixer (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и смешивали в течение 1 мин. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 70°С. Гранулы фиксировали на магните на 5 мин. Удаляли 40 мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Синтез cDNA с использованием набора "ABI High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

Мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора PHКазы и 3,2 мкл  $H_2O$  на реакцию добавляли в 10 мкл общей PHK. cDNA получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, хранение при 4°C.

## **PCR** в режиме реального времени

2 мкл сDNA добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для ALAS1 (Applied Biosystems, № по кат. Hs00167441\_m1) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночные планшеты (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением ΔΔCt(RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали при двух независимых трансфекциях с двумя биологическими повторами каждый и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях, если не указано иное в итоговых таблинах.

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением  $\Delta\Delta$ Ct-способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализов, выполненных с клет-ками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками. IC<sub>50</sub> вычисляли с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с данными для клеток, трансфицированных AD-1955, или наивных клеток в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

### In vitro нокдаун эндогенной экспрессии ALAS1 дуплексами siRNA ALAS1

В табл. 4 показан нокдаун ALAS1 в клетках Hep3B с помощью модифицированных ALAS1 дуплексов siRNA (см. табл. 2). Сайленсинг выражали в виде доли оставшегося транскрипта PHK относительно отрицательного контроля (с люциферазой) siRNA AD-1955. Данные получали, как описано выше, после трансфекции 10 или 0,1 нМ каждой siRNA. qPCR проводили с использованием зонда TaqMan ALAS1 Hs00167441\_m1.

Таблица 4. Экспрессия ALAS1 в клетках Нер3В после трансфекции siRNA ALAS1ІО дуплекса10 нМ,0,1 нМ,10 нМ, STDEV0,1 нМ, STDEV

то дуплекса	TO HIVI,	0,1 HIVI,	TO HIVI, STULY	
	средн.	средн.		
AD-55078.2	0,7	0,87	0,001	0,089
AD-55084.2	0,08	0,3	0	0,04
AD-55090.2	0,06	0,08	0,002	0,003
AD-55096.2	0,61	0,92	0,171	0,34
AD-55102.2	0,63	0,62	0,005	0,069
AD-55106.2	0,07	0,08	0,004	0,027
AD-55111.2	0,06	0,23	0,013	0,062
AD-55073.2	0,21	0,4	0,018	0,061
AD-55079.2	0,17	0,43	0,033	0,089
AD-55085.2	0,13	0,21	0,011	0,019
AD-55091.2	0,27	0,55	0,033	0,009
AD-55097.2	0,31	0,38	0,051	0,059
AD-55103.2	0,05	0,11	0,017	0,006
AD-55107.2	0,12	0,24	0,007	0,008
AD-55112.2	0,15	0,2	0,036	0,025
AD-55074.2	0,16	0,45	0,008	0,002
AD-55080.2	0,79	0,99	0,095	0,304
AD-55086.2	0,09	0,22	0,005	0,035
AD-55098.2	0,25	0,51	0,03	0,07
AD-55104.2	0,06	0,1	0,017	0,001
AD-55108.2	0,47	0,65	0,03	0,015
AD-55113.2	0,38	0,62	0,068	0,039
AD-55075.2	0,12	0,28	0,007	0,051
AD-55081.2	0,21	0,51	0,036	0,066
AD-55087.2	0,1	0,19	0,017	0,02
AD-55093.2	0,24	0,56	0,029	0,053
AD-55099.2	0,05	0,18	0,001	0,038
AD-53573.3	0,67	1,07	0,16	0,153
AD-55109.2	0,07	0,23	0,006	0,052
AD-55114.2	0,08	0,16	0,004	0,017
AD-55076.2	0,05	0,14	0,007	0,035
AD-55082.2	0,08	0,3	0,019	0,016
AD-55088.2	0,06	0,12	0,008	0,02
AD-55094.2	0,06	0,18	0,005	0,023
AD-55100.2	0,45	0,83	0,02	0,05
AD-55105.2	0,02	0,05	0,005	0,004
AD-55110.2	0,15	0,19	0,031	0,016
AD-55115.2	0,35	0,58	0,045	0,052

AD-55077.2	0,14	0,14	0,006	0,019
AD-55083.2	0,56	0,98	0,24	0,188
AD-55089.2	0,62	0,79	0,036	0,094
AD-55095.2	0,59	0,92	0,12	0,079
AD-55101.2	0,71	0,97	0,074	0,097
AD-1955	1,00	1,01	0,03	0,04
AD-53511.1	0,84	1,08	0,028	0,0515
AD-53512.1	0,15	0,65	0,062	0,023
AD-53513.1	0,34	0,86	0,055	0,011
AD-53514.1	0,12	0,61	0,003	0,008
AD-53515.1	0,12	0,66	0,005	0,004
AD-53515.1	1,05	1,02	0,032	0,011
AD-53510.1 AD-53517.1	0,145	0,725	0,032	0,015
AD-53517.1 AD-53518.1	0,143	0,723	0,025	0,0133
AD-53518.1 AD-53519.1	0,72	0,66	0,043	0,028
AD-53519.1 AD-53520.1	0,18	0,66	0,061	0,004
AD-53520.1 AD-53521.1	0,18		0,041	0,001
AD-53521.1 AD-53522.1		1,07 1,1	0,065	0,003
AD-53522.1 AD-53523.1	0,87		<u> </u>	·
AD-53523.1 AD-53524.1	0,48 0,11	0,96	0,0305	0,0255
AD-53524.1 AD-53525.1	0,11	0,66 1,03	0,02	0,006 0,01
AD-53525.1 AD-53526.1	0,71	0,85	0,016	0,01
AD-53520.1 AD-53527.1	0,25	0,83	0,075	0,017
AD-53527.1 AD-53528.1	0,23	0,83	0,013	0,017
AD-53528.1 AD-53529.1	0,44	0,93	0,037	0,000
AD-53529.1 AD-53530.1	0,183	0,73	0,013	0,014
AD-53530.1 AD-53531.1	0,48	0,02	0,019	0,003
AD-53531.1 AD-53532.1	0,48	0,33	0,013	0,003
AD-53532.1	0,36	0,93	0,025	0,034
AD-53533.1	0,1	0,36	0,014	0,012
AD-53535.1	0,58	1,05	0,036	0,071
AD-53536.1	0,12	0,45	0,009	0,026
AD-53537.1	0,73	0,96	0,101	0,015
AD-53538.1	0,74	1,07	0	0,046
AD-53539.1	0,52	0,97	0,057	0,032
AD-53540.1	0,1	0,47	0,017	0,012
AD-53541.1	0,11	0,29	0,026	0,015
AD-53542.1	0,08	0,23	0,008	0,006
AD-53543.1	0,62	1,01	0,027	0,014
1	1		1	1
AD-53544.1	0,8	1,04	0,002	0,001
AD-53545.1	0,17	0,73	0,007	0,007
AD-53546.1	0,27	0,93	0,058	0,019
AD-53547.1	0,12	0,28	0,008	0,01
AD-53548.1	0,1	0,34	0,022	0,002
AD-53549.1	0,8	1,04	0,011	0,026
AD-53550.1	0,05	0,54	0,02	0,003
AD-53551.1	0,96	1,16	0,029	0,044
AD-53552.1	0,13	0,5	0,002	0,009
AD-53553.1	0,92	1,1	0,027	0,02
AD-53554.1	0,76	0,67	0,005	0,004
AD-53555.1	0,11	0,53	0,009	0,007
AD-53561.1	0,72	0,94	0,014	0,001
AD-53567.1	0,16	0,66	0,019	0,003
AD-53573.1	1,06	1,10	0,019	0,037
AD-53579.1	0,19	0,76	0,036	0,019

## IC<sub>50</sub> отдельных дуплексов siRNA ALAS1 в in vitro скрининге

В табл. 5 показаны  $IC_{50}$  отдельных дуплексов siRNA ALAS1, определенные в результате нокдауна эндогенно экспрессируемой ALAS1 в клеточной линии Hep3B с помощью модифицированных ALAS1 дуплексов siRNA (см. табл. 2). Данные были получены, как описано выше, через 24 или 120 ч после трансфекции каждого дуплекса siRNA. В этом примере сайленсинг ALAS1 выражают в виде доли оставшегося транскрипта mRNA относительно siRNA AD-1955, нецелевой siRNA, которую использовали в качестве отрицательного контроля. Данные из повторных экспериментов по трансфекции использовали

для приведения в соответствие одиночной линии для определения  $IC_{50}$ . Несколько из дуплексов (например, AD-53541.1, AD-53542.1 и AD-53547.1) характеризовались  $IC_{50}$  до приблизительно 0,03 нМ через 24 ч. Многие дуплексы характеризовались  $IC_{50}$  до 0,1 нМ (например, AD-53534.1, AD-53536.1, AD-53540.1, AD-53541.1, AD-53542.1, AD-53542.1, AD-53548.1, AD-53550.1, AD-53552.1) через 24 часа, и некоторые из них также характеризовались  $IC_{50}$  ДО 0,1 нМ (например, AD-53534.1, AD-53540.1, AD-53541.1, AD-53542.1, AD-53547.1, AD-53552.1) через 120 ч.

Таблица 5. IC<sub>50</sub> выбранных дуплексов siRNA ALAS1, нормализованных относительно AD-1955

	IC <sub>50</sub> (нМ)			
ID дуплекса	24 часа	120 часов		
AD-53534.1	0,045	0,076		
AD-53536.1	0,049	0,105		
AD-53540.1	0,054	0,077		
AD-53541.1	0,032	0,062		
AD-53542.1	0,028	0,093		
AD-53547.1	0,03	0,062		
AD-53548.1	0,044	0,101		
AD-53550.1	0,085	0,152		
AD-53552.1	0,077	0,063		
AD-53567.1	0,219	0,357		
AD-53579.1	0,217	0,566		

Пример 4. In vivo сайленсинг с применением siRNA ALAS1 мыши/крысы, находящейся в составе в виде LNP

Последовательности модифицированных дуплексов АD-53558 показаны ниже в табл. 6.

Таблица 6. Последовательности дуплекса siRNA ALAS1 AD-53558.4

SEQ ID NO: (смысловая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Исходное положение на транскрипте NM_ 020559.2	Название дуплекса	Смысловая последова- тельность (5'-3')	Антисмысловая последова- тельность (5′-3′)
383	384	1184	AD-53558	cuGuGAAAuuu AcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAA UUUcAcAGdTsdT

Данный дуплекс помещали в состав в виде состава LNP11 (см. табл.10 выше). siRNA AD-53558, находящуюся в составе LNP, исследовали in vivo у мышей (N=25 животных; 5 животных на группу) и крыс (N=20 животных; 4 животных на группу) и было доказано, что она in vivo подвергает сайленсингу mRNA ALAS1. Результаты показаны на фиг. 5 и фиг. 6.

На фиг. 5 показано, что у мышей siRNA характеризовалась эффектом доза-ответ. Экспрессия mRNA ALAS1 (mALAS1) мыши снижалась приблизительно на 78%, когда siRNA вводили в количестве 1 мг/кг; mRNA ALAS1 мыши снижалась приблизительно на 60%, когда siRNA вводили в количестве 0,3 мг/кг и mRNA ALAS1 мыши снижалась приблизительно на 49%, когда siRNA вводили в количестве 0,1 мг/кг. Эти снижения выражали относительно контроля PBS. Также использовали контроль AD-1955 LUC, как показано на фиг. 5.

Аналогично, на фиг. 6 показано, что у крыс siRNA характеризовалась эффектом доза-ответ. Экспрессия mRNA ALAS1 крысы снижалась приблизительно на 70%, когда siRNA вводили в количестве 1 мг/кг; mRNA ALAS1 снижалась приблизительно на 62%, когда siRNA вводили в количестве 0,3 мг/кг, и mRNA ALAS1 снижалась приблизительно на 34%, когда siRNA вводили в количестве 0,1 мг/кг.

Также исследовали длительность сайленсинга у мышей (N=15; 3 животных на временную точку). Результаты показаны на фиг. 7, на которой показано, что AD-53558 подавлял mRNA mALAS1 приблизительно на 80% в течение по меньшей мере 9 дней. Подавление по меньшей мере на 50% сохранялось по меньшей мере в течение 14 дней.

Пример 5. Эффективность siRNA ALAS1 на мышиной модели AIP

Эффекты состава LNP11 с AD-53558 (siRNA ALAS1 мыши/крысы, описанная в предыдущем примере) исследовали на мышиной модели AIP. PBGD нокаут является нежизнеспособным (-/-, 0% активности). Гетерозиготные PBGD нокаутированные мыши (+/-, ~50% активности) способны иметь, но не имеют полный биохимический фенотип и, таким образом, не повторяют фенотип заболевания человека. В связи с этим была разработана мышиная модель AIP, которая представляет собой сложную гетерозиготу с аллелями T1/T2, включая нарушение промотора T1 (+/-) и изменение сайта сплайсинга T2 (-/-). Было показано, что эти мыши характеризуются остаточной активностью PBGD в печени, которая составляет приблизительно ~30% от уровня дикого типа и нормальными или незначительно повышенными исходными уровнями ALA и PBG в плазме. Было обнаружено, что мыши имеют нормальный вид в ранний период жизни, а с возрастом становятся несколько более вялыми и атаксичными. При медико-

патологическом исследовании было отмечено, что к возрасту шести месяцев у мышей развивались нарушенная координация движений и мышечная работа, а также дегенерация аксонов. Исследование патологии мышиной модели показало дегенерацию аксонов, нарушенную координацию движений и мышечную работу у более старых мышей. Было обнаружено, что уровни ALA и PBG в моче и плазме заметно повышаются при последовательном интраперитонеальном введении фенобарбитала (см. Lindberg et al., (1996), Nature Genetics, 12:195-219 и Lindberg et al., (1999), Journal of Clinical Investigation, 103:1127-34). Мышей восстанавливали при помощи AAV-опосредованной экспрессии PBGD в печени (Yasuda et al. (2010), Molecular Medicine, 1:17-22 и Unzu et al. (2011), Molecular Medicine, 2:243-50).

На 1 день мышам вводили 1 мг/кг siRNA ALAS1 (n=5) или контрольного LUC AD-1955 (n=3) путем внутривенной инъекции. Вводили три инъекции фенобарбитала (1 инъекция в сутки на 2, 3 и 4 дни) для индукции ALAS1 в печени и предшественников порфирина, ALA и PBG. Образцы плазмы и ночной мочи собирали на 5 день, а уровни метаболитов измеряли при помощи LC-MS. Уровни метаболитов измеряли в плазме при помощи LC-MS и также измеряли в моче. Исходные уровни метаболитов измеряли перед первой обработкой на 1 день. Результаты показаны на фиг. 8-12 и в табл.12 и 13.

На фиг. 8 и 9 показаны уровни ALA в плазме в мкМ. Исходные уровни ALA были низкими (n=4), а обработка фенобарбиталом индуцировала значимые повышения уровней ALA в плазме у контрольных животных, обработанных siRNA LUC (n=3). Обработка siRNA ALAS1 ингибировала индукцию ALA в плазме (n=5), как показано на фиг. 8. siRNA ALAS1 была неизменно эффективной при блокировании индукции ALA в плазме у каждого из отдельных изученных животных (см. фиг. 9). Данные результаты указывают на то, что обработка siRNA ALAS1 была эффективной в предупреждении повышений уровня ALA в плазме, связанных с индуцированными фенобарбиталом острыми приступами в этой животной модели AIP.

На фиг. 10 и 11 показаны уровни PBG в плазме в мкМ. Исходные уровни PBG были низкими (n=4), а обработка фенобарбиталом индуцировала значимые повышения уровней PBG у контрольных животных, обработанных siRNA LUC (n=3). Обработка siRNA ALAS1 ингибировала индукцию PBG в плазме (n=5), как показано на фиг. 10. siRNA ALAS1 была неизменно эффективной при блокировании индукции PBG в плазме у каждого из отдельных изученных животных (см. фиг. 11). Данные результаты указывают на то, что обработка siRNA ALAS1 была эффективной в предупреждении повышений уровня PBG в плазме, связанных с индуцированными фенобарбиталом острыми приступами в этой животной модели AIP.

В табл. 12 и 13 показаны уровни ALA и PBG в моче на исходном уровне и после обработки фенобарбиталом у контрольных животных, обработанных siRNA LUC (n=2) (CTR, которая относится к животному, обработанному PBS буфером, n=1), и животных, обработанных siRNA ALAS1 (n=5).

Таблица 12. Данные по образцам мочи от отдельных животных, показывающие предупреждение индупированного острого приступа

				terporo npn			
ID мыши	ALA	PBG	Креатинин	ALA	PBG	siRNA	PB
	(микро	(микро	(мг/дл)	(микроМ/мг	(микроМ/мг		
	М/л)	М/л)		креатинина)	креатинина)		
Ha-17-4-6				29,7	7,9	Исходный	-
						уровень	
Ha-19-5-4/2				15,7	5,1	Исходный	-
						уровень	
Ha-20-39-				28,6	6,7	Исходный	-
4/3						уровень	
Ha-20-38-4				21,4	4,7	Исходный	-
						уровень	
Ha-21-33-4	934,92	483,71	0,4205	222,33	115,03	Luc	+
Ha-21-36-9	944,08	563,53	0,5055	186,76	111,48	Luc	+
Ha-21-18-8	32,88	8,69	0,133	24,72	6,53	ALAS1;	+
	1 .	,	'	,	'	1 мг/кг	
Ha-21-33-7	83,07	23,28	0,426	19,50	5,46	ALAS1;	+
					[ '	1 мг/кг	
Ha-21-34-5	59,15	18,41	0,263	22,49	7,00	ALAS1;	+
	'''	'''	'	'	<i>'</i>	1 мг/кг	

РВ означает фенобарбитал. А "+" указывает, что вводили фенобарбитал.

Таблица 13. Средние данные по образцам мочи

Состояние	Среднее значение ALA	Среднее значение PBG
	(микроМ/мг креатинина)	(микроМ/мг креатинина)
Исходный уровень AIP	23,8	6,1
Luc-siRNA	204,55	113,26
ALAS1-siRNA	22,24	6,33

Обработка фенобарбиталом индуцировала сильные повышения (~25-30-кратные повышения) ALA (~9-кратное по сравнению с исходными уровнями) и PBG (~19-кратное по сравнению с исходными уровнями) в моче у мышей, обработанных siRNA LUC, т.е. контроле, в то время как такие повышения не наблюдались у животных, обработанных siRNA ALAS1. Таким образом, siRNA ALAS1 блокировала индуцированные фенобарбиталом повышения уровней ALA и PBG в моче. Данные результаты согласуются с измерениями в плазме и показывают, что обработка siRNA ALAS1 была эффективной в предупреждении

повышений уровней метаболитов в моче (ALA и PBG), связанных с индуцированными фенобарбиталом острыми приступами в этой животной модели AIP.

В дополнительных экспериментах (фиг. 12) было обнаружено, что обработка фенобарбиталом индуцировала большие повышения (~25-кратные) экспрессии mRNA ALAS1 в печени в мышиной модели. Введение siRNA ALAS1 полностью блокировало эту индукцию mRNA ALAS1. Данные результаты представляют дополнительное доказательство того, что siRNA ALAS1 является эффективной в животной модели AIP.

В обобщенном смысле из результатов, представленных в этом примере, видно, что siRNA ALAS1 является эффективной в лечении острых приступов в животной модели острой печеночной порфирии, AIP. Измерения нескольких результатов подтверждают это заключение, в том числе уровни ALA в плазме, уровни PBG в плазме, уровни PBG в моче и уровни экспрессии mRNA ALAS1 в печени.

Пример 6. In vivo сайленсинг при помощи конъюгированных с GalNAc siRNA ALAS1 мыши

В экспериментах, описанных в этом примере, исследовали in vivo эффективность трех конъюгированных с GalNAc siRNA (см. табл.7). Эти siRNA конструировали и получали при помощи способов, таких как описанные в примере 2.

		•		, ,		
SEQ ID	SEQ ID NO:	Положение	Название	Смысловая	Антисмысловая	Положение
NO:	(антисмыс	смысловой	дуплекса	последовательность	последовательность	антисмысловой
(смысл	ловая)	CMBIC/IOBOVI		(5'-3')	(5'-3')	последователь-
овая)		последователь				ности на
						транскрипте
		ности на				NM_ 020559.2
		транскрипте				
		NM_ 020559.2				
385	386	775-795	AD-56211	AfaGfuCfuGfuUfUfCfc AfcUfuUfuCfaAfL96	uUfgAfaAfaGfuGfgaa AfcAfgAfcUfusUfsg	773-795
387	388	2168-2188	AD-56173	AfcAfuAfgUfaGfCfCfa GfaAfuUfgUfcUfL96	aGfaCfaAfuUfcUfggc UfaCfuAfuGfusGfsg	2166-2188
389	390	775-795	AD-57929	AfsasGfuCfuGfuUfUfC fcAfcUfuUfuCfaAfL96	usUfsgAfaAfaGfuGfga aAfcAfgAfcUfususg	773-795

Таблица 7. Последовательности AD-57929

Мышей (n=40; n=4 на экспериментальное условие) разделяли на группы, которые получали PBS или дозы по 3 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг siRNA, вводимые подкожно. Уровень mRNA mA-LAS1/mGAPDH относительно контроля PBS определяли в клетках печени через 72 часа после введения. Результаты показаны на фиг. 13. Наблюдался нечеткий эффект доза-ответ для siRNA AD-56211 и AD-56173. В отличие от этого, siRNA ALAS1 AD-57929 проявил эффект доза-ответ при ингибировании экспрессии mALAS1. По данным результатам видно, что конъюгат GalNAc с ALAS1 был эффективным при ингибировании экспрессии mRNA ALAS1 in vivo и проявлял эффект доза-ответ.

Пример 7. siRNA человека

Дополнительные siRNA человека конструировали и получали, как описано в примере 2. Лучшие 45 siRNA отбирали на основании их прогнозируемой эффективности. Последовательности из этих 45 siRNA представлены в табл. 8 и при этом прилагается перечень последовательностей (например, смысловая последовательность, соответствующая одной из последовательностей с нечетным номером, идентифицированных под SEQ ID NO: 391-551, и антисмысловая последовательность, соответствующая одной из последовательностей с четным номером, идентифицированных под SEQ ID NO: 392-552 соответственно). Табл. 8 раскрыта в международной публикации № WO 2013/155204A2. Содержимое WO 2013/155204 и перечень последовательностей, в том числе таблица 8, явным образом включены при помощи ссылки.

Пример 8. siRNA человека

Получали дополнительные siRNA человека из 19 нуклеотидов. Последовательности из этих siRNA представлены в табл. 9 и при этом прилагается перечень последовательностей (например, смысловая последовательность, соответствующая одной из последовательностей с нечетным номером, идентифицированных под SEQ ID NO: 553-3365, и антисмысловая последовательность, соответствующая одной из последовательностей с четным номером, идентифицированных под SEQ ID NO: 554-3366 соответственно). Табл. 9 раскрыта в международной публикации № WO 2013/155204A2. Содержимое WO 2013/155204 и перечень последовательностей, в том числе табл. 9, явным образом включены при помощи ссылки. Эти siRNA можно исследовать в отношении эффективности с помощью способов, описанных в данном документе, и/или способов, известных из уровня техники.

Пример 9. Подавление предшественников порфиринов при помощи siRNA ALAS1 при парадигме неотложного лечения

Мышиную модель AIP (см. пример 5) использовали для исследования того, будет ли siRNA ALAS1 функционировать в качестве парадигмы неотложного лечения для снижения уже повышенных уровней

ALA и PBG, которые бы присутствовали, например, когда пациент-человек с порфирией испытывает острый приступ. Введение siRNA состава LNP11 с AD-53558 в количестве 1 мг/кг через 12 ч после последней дозы фенобарбитала быстро снижало уровни как ALA, так и PBG в плазме мышей, в то время как у контрольных животных, обработанных Luc, уровни продолжали расти (фиг. 14). Эти результаты указывали на то, что siRNA ALAS является эффективной для лечения острого приступа. siRNA ALAS1 была эффективной для снижения и предупреждения дальнейших повышений уровней ALA и PBG.

Как можно видеть на фиг. 14, siRNA ALAS характеризовалась быстрым началом действия в снижении уровней ALA и PBG. Начало действия происходило в течение нескольких часов после введения siR-NA. Эффект на уровень ALA в плазме мог наблюдаться в течение 4 ч после введения siRNA (см. фиг. 14; siRNA вводили через 12 ч после последней дозы фенобарбитала, а снижение уровня ALA в плазме относительно контроля можно было наблюдать через 16 ч после последней дозы фенобарбитала). Эффект на уровень PBG в плазме мог наблюдаться в течение 8 ч после введения siRNA (см. фиг. 14; siRNA вводили через 12 ч после последней дозы фенобарбитала, а снижение уровня ALA в плазме относительно контроля можно было наблюдать через 20 ч после последней дозы фенобарбитала).

Пример 10. siRNA, которые нацелены на ALAS1

Конструировали дополнительные немодифицированные и модифицированные последовательности siRNA, которые нацеливают siRNA ALAS1, и получали их, как описано в примере 2. Активность in vitro модифицированных дуплексов исследовали, как описано ниже.

#### Способы

#### Опосредованная липидами трансфекция

Для Нер3В, РМН и первичных гепатоцитов Cynomolgus трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Восемьдесят мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих соответствующее число клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК.

Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса, модифицированного GalNAc, 1 мкМ, 500, 20, 10 и 0,2 нМ.

## Трансфекция посредством свободного поглощения

Криоконсервированные первичные гепатоциты Cynomolgus (Celsis In Vitro Technologies, M003055-P) размораживали на водяной бане при 37°C непосредственно перед использованием и ресуспендировали в количестве 0,26×10<sup>6</sup> клеток/мл в среде InVitroGRO CP (с покрытием) (Celsis In Vitro Technologies, № по кат. Z99029). Во время трансфекций клетки помещали в 96-луночный планшет с коллагеном BD BioCoat (BD, 356407) по 25000 клеток на лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Эксперименты по свободному поглощению выполняли путем добавления 10 мкл дуплексов siRNA в PBS на лунку в 96-луночном (96w) планшете. Девяносто мкл полных питательных сред, содержащих соответствующее число клеток для типа клеток, затем добавляли к siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 1 мкМ, 500, 20 и 10 нМ.

# Выделение общей РНК с использованием набора "DYNABEADS mRNA Isolation Kit" (Invitrogen, № no кат. 610-12)

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем перемешивали в течение 5 мин при 850 об./мин. с помощью Ерреndorf Thermomixer (скорость перемешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и перемешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и перемешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и перемешивали в течение 1 мин. Гранулы снова фиксировали, а супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, фиксировали и супернатант удаляли. В конце гранулы оставляли высыхать в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 70°С. Гранулы фиксировали на магните на 5 мин. Удаляли сорок пять мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Синтез cDNA с использованием набора "ABI High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

Получали мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0.8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора PHКазы и 3.2 мкл  $H_2O$  на реакцию. Равные объемы мастермикса и PHK смешивали для конечного объема в 12 мкл для in vitro отслеживаемых образцов или 20 мкл для in vivo отслеживаемых образцов. cDNA получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий:  $25^{\circ}$ C 10 мин,  $37^{\circ}$ C 120 мин,  $85^{\circ}$ C 5 с

и хранение при 4°C.

#### **PCR** в режиме реального времени

Два мкл сDNA добавляли к мастер-миксу, содержащему 2 мкл H<sub>2</sub>O, 0,5 мкл зонда ТаqMan GAPDH (Life Technologies, № по кат. 4326317Е для клеток Нер3В, № по кат. 352339Е для первичных гепатоцитов мыши или сделанный по индивидуальному заказу зонд для первичных гепатоцитов макак-крабоедов), 0,5 мкл зонда ТаqMan C5 (Life Technologies, № по кат. Hs00167441\_ml для клеток Нер3В или Mm00457879\_ml для первичных гепатоцитов мыши или сделанный по индивидуальному заказу зонд для первичных гепатоцитов макак-крабоедов) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных (384 w) планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением ΔΔСt(RQ)-анализа. Для in vitro скрининга каждый дуплекс исследовали с двумя биологическими повторами, если не указано иное, и каждую PCR в реальном времени выполняли с двойными техническими повторами. Для in vivo скрининга каждый дуплекс исследовали в одном или нескольких экспериментах (3 мыши на группу) и каждую PCR в реальном времени выполняли с двойными техническими повторами.

Для вычисления относительного кратного изменения уровней mRNA ALAS1 данные в реальном времени анализировали с применением  $\Delta\Delta$ Ct-способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализов, выполненных с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками. IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с данными для клеток, трансфицированных AD-1955, в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 являются такими, которые приведены ниже.

Смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 3682);

Антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 3683).

Последовательности одиночных нитей и дуплексов модифицированных и немодифицированных siRNA представлены в табл. 14 и 5 соответственно.

Таблица 14. Модифицированные последовательности одиночных нитей и дуплексов ALAS1 человека

SEQ ID	SEQ	Название	Смысловая	Антисмысловая	Целевые
NO:	ID	дуплекса	последовательность (5'-3')	последовательность (5'-3')	сайты
(смысл	NO:				антисмысло
овая)	(анти   -				
	смыс				вой
	лова				последовате
	я)				льности
					NM_
					000688.4
3371	3372		CfsasUfgCfcAfaAfAfAfuGfgAfcAfu	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgCfaUf	1635-1657
0072	5572	AD-58848	CfaUfL96	gsAfsc	2000 2007
3373	3374		AfsusUfuUfgAfaGfUfGfaUfgAfgUf	usUfsuCfaCfuCfaUfcacUfuCfaAfaAfu	2189-2211
		AD-58849	gAfaAfL96	sGfsc	
3375	3376		AfsgsUfuAfuAfuUfAfAfaUfuUfuAf	asGfsaUfuAfaAfaUfuuaAfuAfuAfaCf	2344-2366
3377	3378	AD-58850	aUfcUfL96 GfscsAfuUfuUfgAfAfGfuGfaUfgAf	usUfsa usCfsaCfuCfaUfcAfcuuCfaAfaAfuGfc	2187-2209
33//	33/6	AD-58851	gUfgAfL96	sAfsg	2187-2209
3379	3380		GfsasAfcUfaAfuGfAfGfcAfgAfcAfu	gsUfsuAfuGfuCfuGfcucAfuUfaGfuUf	1975-1997
		AD-58852	AfaCfL96	csAfsu	
3381	3382		AfsasUfgAfcCfaCfAfCfcUfaUfcGfa	asAfscUfcGfaUfaGfgugUfgGfuCfaUf	973-995
		AD-58853	GfuUfL96	usCfsu	
3383	3384	AD-58854	UfsasAfaUfuUfuAfAfUfcUfaUfaGf uAfaAfL96	usUfsuAfcUfaUfaGfauuAfaAfaUfuUf asAfsu	2352-2374
3385	3386	AD-38834	UfsusCfaGfuAfuGfAfUfcGfuUfuCf	csAfsaAfgAfaAfcGfaucAfuAfcUfgAfa	929-951
		AD-58855	uUfuGfL96	sAfsa	
3387	3388		CfsasCfuUfuUfcAfGfUfaUfgAfuCf	asAfsaCfgAfuCfaUfacuGfaAfaAfgUfg	924-946
		AD-58856	gUfuUfL96	sGfsa	
3389	3390	AD-58857	AfsasAfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUf uCfaGfL96	csUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfuUf usUfsg	913-935
3391	3392	AD-36637	CfsasUfuUfgAfaAfCfUfgUfcCfaUf	usUfsgAfaUfgGfaCfaguUfuCfaAfaUf	1478-1500
3331	3332	AD-58858	uCfaAfL96	gsCfsc	1478 1300
3393	3394		CfscsUfaUfcGfaGfUfUfuUfuAfaAf	csAfsgUfuUfuAfaAfaacUfcGfaUfaGf	983-1005
		AD-58859	aCfuGfL96	gsUfsg	
3395	3396		GfsasCfcAfgAfaAfGfAfgUfgUfcUfc	gsAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfuGfgUf	872-894
2207	2200	AD-58861	AfuCfL96	csUfsu	973 905
3397	3398	AD-58862	AfscsCfaGfaAfaGfAfGfuGfuCfuCfa UfcUfL96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcUfgGf usCfsu	873-895
3399	3400	AD-36602	AfscsUfaAfuGfaGfCfAfgAfcAfuAfa	asUfsgUfuAfuGfuCfugcUfcAfuUfaGf	1977-1999
		AD-58863	CfaUfL96	usUfsc	
3401	3402		UfsasGfuAfaAfaAfCfAfuAfgUfcCfu	usCfscAfgGfaCfuAfuguUfuUfuAfcUf	2366-2388
	L	AD-58864	GfgAfL96	asUfsa	
3403	3404	AD-58865	UfsasUfuUfcUfgGfAfAfcUfaGfuAf aAfuUfL96	asAfsuUfuAfcUfaGfuucCfaGfaAfaUf asUfsu	1185-1207
3405	3406	AD-30003	UfsusCfuGfcAfaAfGfCfcAfgUfcUfu	csUfscAfaGfaCfuGfgcuUfuGfcAfgAfa	706-728
3403	3,00	AD-58867	GfaGfL96	sGfsa	, 50 , 20
3407	3408		GfsasGfgAfaAfgAfGfGfuUfgCfuGf	gsUfsuUfcAfgCfaAfccuCfuUfuCfcUfc	759-781
		AD-58868	aAfaCfL96	sAfsc	

3409	3410	AD-58869	GfsgsUfaCfuAfgAfAfAfuAfuUfuCf uGfgAfL96	usCfscAfgAfaAfuAfuuuCfuAfgUfaCfc sAfsc	1174-1196
3411	3412	AD-58870	GfsasCfaUfcAfuGfCfAfaAfaGfcAfa AfgAfL96	usCfsuUfuGfcUfuUfugcAfuGfaUfgUf csCfsu	853-875
3413	3414	AD-58871	AfsasAfuUfuUfaAfUfCfuAfuAfgUf aAfaAfL96	usUfsuUfaCfuAfuAfgauUfaAfaAfuUf usAfsa	2353-2375
3415	3416	AD-58873	CfsasUfgAfuCfcAfAfGfgGfaUfuCfg AfaAfL96	usUfsuCfgAfaUfcCfcuuGfgAfuCfaUf gsGfsa	1362-1384
3417	3418	AD-58874	AfsgsAfcCfaGfaAfAfGfaGfuGfuCf uCfaUfL96	asUfsgAfgAfcAfcUfcuuUfcUfgGfuCf usUfsu	871-893
3419	3420	AD-58875	AfsusCfcUfgAfaGfAfGfcGfcUfgAfg GfgAfL96	usCfscCfuCfaGfcGfcucUfuCfaGfgAfu sCfsc	1810-1832
3421	3422	AD-58876	GfsusCfuGfuGfaUfGfAfaCfuAfaUf gAfgCfL96	gsCfsuCfaUfuAfgUfucaUfcAfcAfgAfc sUfsu	1966-1988
3423	3424	AD-58877	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf cUfuCfL96	gsAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfg sGfsu	875-897
3425	3426	AD-58878	AfscsUfuUfuCfaGfUfAfuGfaUfcGf uUfuCfL96	gsAfsaAfcGfaUfcAfuacUfgAfaAfaGfu sGfsg	925-947
3427	3428	AD-58879	UfscsAfuGfcCfaAfAfAfaUfgGfaCfa UfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcAfuGf asCfsu	1634-1656
3429	3430	AD-58880	AfsasUfaUfuUfcUfGfGfaAfcUfaGf uAfaAfL96	usUfsuAfcUfaGfuUfccaGfaAfaUfaUf usUfsc	1183-1205
3431	3432	AD-58881	CfsusUfcUfuCfaAfGfAfuAfaCfuUf gCfcAfL96	usGfsgCfaAfgUfuAfucuUfgAfaGfaAf gsAfsu	892-914
3433	3434	AD-58882	UfsusUfcAfgUfaUfGfAfuCfgUfuUf cUfuUfL96	asAfsaGfaAfaCfgAfucaUfaCfuGfaAfa sAfsg	928-950
3435	3436	AD-58883	CfscsCfaGfuGfuGfGfUfuAfgUfgUf gAfaAfL96	usUfsuCfaCfaCfuAfaccAfcAfcUfgGfg sGfsc	790-812
3437	3438	AD-58884	GfscsUfgUfgAfgAfUfUfuAfcUfcUf gAfuUfL96	asAfsuCfaGfaGfuAfaauCfuCfaCfaGfc sCfsu	1325-1347
3439	3440	AD-58885	AfsgsGfcUfuGfaGfCfAfaGfuUfgGf uAfuCfL96	gsAfsuAfcCfaAfcUfugcUfcAfaGfcCfu sGfsa	2229-2251
3441	3442	AD-58886	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc sUfsg	877-899
3443	3444	AD-58887	AfsusUfuCfuGfgAfAfCfuAfgUfaAf aUfuCfL96	gsAfsaUfuUfaCfuAfguuCfcAfgAfaAf usAfsu	1186-1208
3445	3446	AD-58888	UfsgsUfgAfuGfuGfGfCfcCfaUfgAf gUfuUfL96	asAfsaCfuCfaUfgGfgccAfcAfuCfaCfa sCfsa	1531-1553
3447	3448	AD-58889	AfsasGfaGfaGfaAfGfUfcCfuAfuUf uCfuCfL96	gsAfsgAfaAfuAfgGfacuUfcUfcUfcUf usUfsc	2208-2230
3449	3450	AD-58890	UfsgsGfcAfgCfaCfAfGfaUfgAfaUfc AfgAfL96	usCfsuGfaUfuCfaUfcugUfgCfuGfcCf asGfsg	671-693
3451	3452	AD-58891	AfsusGfaUfcGfuUfUfCfuUfuGfaGf aAfaAfL96	usUfsuUfcUfcAfaAfgaaAfcGfaUfcAf usAfsc	935-957
3453	3454	AD-58892	UfscsUfgGfaAfcUfAfGfuAfaAfuUf cCfaUfL96	asUfsgGfaAfuUfuAfcuaGfuUfcCfaGf asAfsa	1189-1211
3455	3456	AD-59095	GfscsCfcAfuUfcUfUfAfuCfcCfgAfg UfL96	asCfsuCfgGfgAfuAfagaAfuGfgsgsc	360-382
3457	3458	AD-59096	GfsgsAfaCfcAfuGfCfCfuCfcAfuGfa UfL96	asUfscAfuGfgAfgGfcauGfgUfuscsc	1347-1369
3459	3460	AD-59097	UfsgsGfaGfuCfuGfUfGfcGfgAfuCf cUfL96	asGfsgAfuCfcGfcAfcagAfcUfcscsa	1794-1816
3461	3462	AD-59098	CfsasCfcCfaCfgGfGfUfgUfgUfgGfg AfL96	usCfscCfaCfaCfaCfccgUfgGfgsusg	1112-1134
3463	3464	AD-59099	GfsgsAfgUfcUfgUfGfCfgGfaUfcCf uAfL96	usAfsgGfaUfcCfgCfacaGfaCfuscsc	1795-1817

3465	3466	AD-59100	CfsasAfaAfcUfgCfCfCfcAfaGfaUfg AfL96	usCfsaUfcUfuGfgGfgcaGfuUfususg	428-450
3467	3468	AD-59101	GfscsCfuCfcAfuGfAfUfcCfaAfgGfg AfL96	usCfscCfuUfgGfaUfcauGfgAfgsgsc	1355-1377
3469	3470	AD-59102	CfsasUfcAfuCfcCfUfGfuGfcGfgGfu UfL96	asAfscCfcGfcAfcAfgggAfuGfasusg	1921-1943
3471	3472	AD-59103	AfscsCfcAfcGfgGfUfGfuGfuGfgGf gAfL96	usCfscCfcAfcAfcAfcccGfuGfgsgsu	1113-1135
3473	3474	AD-59104	CfsasCfaUfcAfuCfCfCfuGfuGfcGfg AfL96	usCfscGfcAfcAfgGfgauGfaUfgsusg	1919-1941
3475	3476	AD-59105	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf cUfL96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcsusg	873-895
3477	3478	AD-59106	CfscsUfcCfaUfgAfUfCfcAfaGfgGfa UfL96	asUfscCfcUfuGfgAfucaUfgGfasgsg	1356-1378
3479	3480	AD-59107	UfsgsCfcCfaUfuCfUfUfaUfcCfcGfa AfL96	usUfscGfgGfaUfaAfgaaUfgGfgscsa	359-381
3481	3482	AD-59108	CfsusUfcAfcCfcUfGfGfcUfaAfgAfu AfL96	usAfsuCfuUfaGfcCfaggGfuGfasasg	1297-1319
3483	3484	AD-59109	AfsusCfaUfcCfcUfGfUfgCfgGfgUfu AfL96	usAfsaCfcCfgCfaCfaggGfaUfgsasu	1922-1944
3485	3486	AD-59110	AfsgsAfaAfgAfgUfGfUfcUfcAfuCfu UfL96	asAfsgAfuGfaGfaCfacuCfuUfuscsu	874-896
3487	3488	AD-59111	CfsusCfcAfuGfaUfCfCfaAfgGfgAfu UfL96	asAfsuCfcCfuUfgGfaucAfuGfgsasg	1357-1379
3489	3490	AD-59112	CfscsAfuUfcUfuAfUfCfcCfgAfgUfc AfL96	usGfsaCfuCfgGfgAfuaaGfaAfusgsg	362-384
3491	3492	AD-59113	CfsasCfcCfuGfgCfUfAfaGfaUfgAfu AfL96	usAfsuCfaUfcUfuAfgccAfgGfgsusg	1300-1322
3493	3494	AD-59114	UfscsAfuCfcCfuGfUfGfcGfgGfuUf gAfL96	usCfsaAfcCfcGfcAfcagGfgAfusgsa	1923-1945
3495	3496	AD-59115	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCf uUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcsusu	877-899
3497	3498	AD-59116	GfsusCfaUfgCfcAfAfAfaAfuGfgAfc AfL96	usGfsuCfcAfuUfuUfuggCfaUfgsasc	1631-1653
3499	3500	AD-59117	CfsasUfuCfuUfaUfCfCfcGfaGfuCfc AfL96	usGfsgAfcUfcGfgGfauaAfgAfasusg	363-385
3501	3502	AD-59118	AfscsCfcUfgGfcUfAfAfgAfuGfaUfg AfL96	usCfsaUfcAfuCfuUfagcCfaGfgsgsu	1301-1323
3503	3504	AD-59119	CfsusCfuUfcAfcCfCfUfgGfcUfaAfg AfL96	usCfsuUfaGfcCfaGfgguGfaAfgsasg	1295-1317
3505	3506	AD-59120	AfsusGfcCfaAfaAfAfUfgGfaCfaUfc AfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcsasu	1634-1656
3507	3508	AD-59121	UfsgsCfcCfcAfaGfAfUfgAfuGfgAfa UfL96	asUfsuCfcAfuCfaUfcuuGfgGfgscsa	434-456
3509	3510	AD-59122	GfsasAfcCfaUfgCfCfUfcCfaUfgAfu AfL96	usAfsuCfaUfgGfaGfgcaUfgGfususc	1348-1370
3511	3512	AD-59123	UfscsUfuCfaCfcCfUfGfgCfuAfaGfa UfL96	asUfscUfuAfgCfcAfgggUfgAfasgsa	1296-1318
3513	3514	AD-59124	UfsgsCfcAfaAfaAfUfGfgAfcAfuCfa UfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgscsa	1635-1657
3515	3516	AD-59125	CfscsAfgAfaAfgAfGfUfgUfcUfcAfu AfL96	usAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfusgsg	872-894
3517	3518	AD-59126	GfsasAfaCfuGfuCfCfAfuUfcAfaUfg AfL96	usCfsaUfuGfaAfuGfgacAfgUfususc	1481-1503
3519	3520	AD-59127	UfscsAfcCfcUfgGfCfUfaAfgAfuGfa UfL96	asUfscAfuCfuUfaGfccaGfgGfusgsa	1299-1321
3521	3522	AD-59128	CfscsCfuGfgAfgUfCfUfgUfgCfgGfa UfL96	asUfscCfgCfaCfaGfacuCfcAfgsgsg	1791-1813
3523	3524	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf uAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfususc	875-897
3525	3526	AD-59130	UfsgsGfaGfcCfcUfGfGfaGfuCfuGf uAfL96	usAfscAfgAfcUfcCfaggGfcUfcscsa	1786-1808
	•			i .	

Таблица 15. Немодифицированные последовательности одиночных нитей и дуплексов ALAS1 человека

SEQ ID	SEQ	Название	Смысловая	Антисмысловая	Целевые
NO: (смысл	ID NO:	дуплекса	последовательность (5'-3')	последовательность (5'-3')	сайты
овая)	(анти				антисмысло
	-				вой
	смыс				ВОИ
	лова				последовате
	я)				льности
					NM
					_
					000688.4
3684	3527	AD-58848	CAUGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCAUGAC	1635-1657
3528	3529	AD-58849	AUUUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAAAUGC	2189-2211
3530	3531	AD-58850	AGUUAUAUUAAAUUUUAAUCU	AGAUUAAAAUUUAAUAUAACUUA	2344-2366
3532	3533	AD-58851	GCAUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUCAUCACUUCAAAAUGCAG	2187-2209
3534	3535	AD-58852	GAACUAAUGAGCAGACAUAAC	GUUAUGUCUGCUCAUUAGUUCAU	1975-1997
3536	3537	AD-58853	AAUGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCAUUCU	973-995
3538	3539	AD-58854	UAAAUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUUUAAU	2352-2374
3540	3541	AD-58855	UUCAGUAUGAUCGUUUCUUUG	CAAAGAAACGAUCAUACUGAAAA	929-951
3542	3543	AD-58856	CACUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAGUGGA	924-946
3544	3545	AD-58857	AAAUCUGUUUCCACUUUUCAG	CUGAAAAGUGGAAACAGAUUUUG	913-935
3546	3547	AD-58858	CAUUUGAAACUGUCCAUUCAA	UUGAAUGGACAGUUUCAAAUGCC	1478-1500
3548	3549	AD-58859	CCUAUCGAGUUUUUAAAACUG	CAGUUUUAAAAACUCGAUAGGUG	983-1005
3550	3551	AD-58861	GACCAGAAAGAGUGUCUCAUC	GAUGAGACACUCUUUCUGGUCUU	872-894
3552	3553	AD-58862	ACCAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUGGUCU	873-895
3554	3555	AD-58863	ACUAAUGAGCAGACAUAACAU	AUGUUAUGUCUGCUCAUUAGUUC	1977-1999
3556	3557	AD-58864	UAGUAAAAACAUAGUCCUGGA	UCCAGGACUAUGUUUUUACUAUA	2366-2388
3558	3559	AD-58865	UAUUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUUCCAGAAAUAUU	1185-1207
3560	3561	AD-58867	UUCUGCAAAGCCAGUCUUGAG	CUCAAGACUGGCUUUGCAGAAGA	706-728
3562	3563	AD-58868	GAGGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUCAGCAACCUCUUUCCUCAC	759-781
3564	3565	AD-58869	GGUACUAGAAAUAUUUCUGGA	UCCAGAAAUAUUUCUAGUACCAC	1174-1196
3566	3567	AD-58870	GACAUCAUGCAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUGUCCU	853-875
3568	3569	AD-58871	AAAUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAGAUUAAAAUUUAA	2353-2375
3570	3571	AD-58873	CAUGAUCCAAGGGAUUCGAAA	UUUCGAAUCCCUUGGAUCAUGGA	1362-1384
3572	3573	AD-58874	AGACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUCUUUCUGGUCUUU	871-893
3574	3575	AD-58875	AUCCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCCUCAGCGCUCUUCAGGAUCC	1810-1832
3576	3577	AD-58876	GUCUGUGAUGAACUAAUGAGC	GCUCAUUAGUUCAUCACAGACUU	1966-1988
3578	3579	AD-58877	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU	875-897

2500	2504	AD 50070	L A CHURUNGA CHANGANICANICA	CAAACCAUCAUACUCAAAACUCC	T 025 047
3580	3581	AD-58878	ACUUUUCAGUAUGAUCGUUUC	GAAACGAUCAUACUGAAAAGUGG	925-947
3582	3583	AD-58879	UCAUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAUGACU	1634-1656
3584	3585	AD-58880	AAUAUUUCUGGAACUAGUAAA	UUUACUAGUUCCAGAAAUAUUUC	1183-1205
3586	3587	AD-58881	CUUCUUCAAGAUAACUUGCCA	UGGCAAGUUAUCUUGAAGAAGAU	892-914
3588	3589	AD-58882	UUUCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGAAAAG	928-950
3590	3591	AD-58883	CCCAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUGGGGC	790-812
3592	3593	AD-58884	GCUGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACAGCCU	1325-1347
3594	3595	AD-58885	AGGCUUGAGCAAGUUGGUAUC	GAUACCAACUUGCUCAAGCCUGA	2229-2251
3596	3597	AD-58886	GAAAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUUUCUG	877-899
3598	3599	AD-58887	AUUUCUGGAACUAGUAAAUUC	GAAUUUACUAGUUCCAGAAAUAU	1186-1208
3600	3601	AD-58888	UGUGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCACACA	1531-1553
3602	3603	AD-58889	AAGAGAGAAGUCCUAUUUCUC	GAGAAAUAGGACUUCUCUCUUUC	2208-2230
3604	3605	AD-58890	UGGCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGCCAGG	671-693
3606	3607	AD-58891	AUGAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAGAAACGAUCAUAC	935-957
3608	3609	AD-58892	UCUGGAACUAGUAAAUUCCAU	AUGGAAUUUACUAGUUCCAGAAA	1189-1211
3610	3611	AD-59095	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC	360-382
3612	3613	AD-59096	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC	1347-1369
3614	3615	AD-59097	UGGAGUCUGUGCGGAUCCU	AGGAUCCGCACAGACUCCA	1794-1816
3616	3617	AD-59098	CACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCCACACACCCGUGGGUG	1112-1134
3618	3619	AD-59099	GGAGUCUGUGCGGAUCCUA	UAGGAUCCGCACAGACUCC	1795-1817
3620	3621	AD-59100	CAAAACUGCCCCAAGAUGA	UCAUCUUGGGGCAGUUUUG	428-450
3622	3623	AD-59101	GCCUCCAUGAUCCAAGGGA	UCCCUUGGAUCAUGGAGGC	1355-1377
3624	3625	AD-59102	CAUCAUCCCUGUGCGGGUU	AACCCGCACAGGGAUGAUG	1921-1943
3626	3627	AD-59103	ACCCACGGGUGUGUGGGGA	UCCCCACACACCCGUGGGU	1113-1135
3628	3629	AD-59104	CACAUCAUCCCUGUGCGGA	UCCGCACAGGGAUGAUGUG	1919-1941
3630	3631	AD-59105	CAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUG	873-895
3632	3633	AD-59106	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG	1356-1378
3634	3635	AD-59107	UGCCCAUUCUUAUCCCGAA	UUCGGGAUAAGAAUGGGCA	359-381
3636	3637	AD-59108	CUUCACCCUGGCUAAGAUA	UAUCUUAGCCAGGGUGAAG	1297-1319
3638	3639	AD-59109	AUCAUCCCUGUGCGGGUUA	UAACCCGCACAGGGAUGAU	1922-1944
3640	3641	AD-59110	AGAAAGAGUGUCUCAUCUU	AAGAUGAGACACUCUUUCU	874-896
3642	3643	AD-59111	CUCCAUGAUCCAAGGGAUU	AAUCCCUUGGAUCAUGGAG	1357-1379
3644	3645	AD-59112	CCAUUCUUAUCCCGAGUCA	UGACUCGGGAUAAGAAUGG	362-384
3646	3647	AD-59113	CACCCUGGCUAAGAUGAUA	UAUCAUCUUAGCCAGGGUG	1300-1322
3648	3649	AD-59114	UCAUCCCUGUGCGGGUUGA	UCAACCCGCACAGGGAUGA	1923-1945
3650	3651	AD-59115	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU	877-899
3652	3653	AD-59116	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC	1631-1653
3654	3655	AD-59117	CAUUCUUAUCCCGAGUCCA	UGGACUCGGGAUAAGAAUG	363-385
3656	3657	AD-59118	ACCCUGGCUAAGAUGAUGA	UCAUCAUCUUAGCCAGGGU	1301-1323
3658	3659	AD-59119	CUCUUCACCCUGGCUAAGA	UCUUAGCCAGGGUGAAGAG	1295-1317
3660	3661	AD-59120	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU	1634-1656
3662	3663	AD-59121	UGCCCCAAGAUGAUGGAAU	AUUCCAUCAUCUUGGGGCA	434-456
3664	3665	AD-59122	GAACCAUGCCUCCAUGAUA	UAUCAUGGAGGCAUGGUUC	1348-1370
3666	3667	AD-59123	UCUUCACCCUGGCUAAGAU	AUCUUAGCCAGGGUGAAGA	1296-1318
3668	3669	AD-59124	UGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCA	1635-1657
3670	3671	AD-59124 AD-59125	CCAGAAAGAGUGUCUCAUA	UAUGAGACACUCUUUCUGG	872-894
3672	3673	AD-59125 AD-59126	GAAACUGUCCAUUCAAUGA	UCAUUGAAUGGACAGUUUC	1481-1503
3674	3675	AD-59120 AD-59127	UCACCCUGGCUAAGAUGAU	AUCAUCUUAGCCAGGGUGA	1299-1321
3676	3677	AD-59127 AD-59128	CCCUGGAGUCUGUGCGGAU	AUCCGCACAGACUCCAGGG	1791-1813
3678	3679	AD-59128 AD-59129	GAAAGAGUGUCUCAUCUUA	UAAGAUGAGACACUCUUUC	875-897
					-
3680	3681	AD-59130	UGGAGCCCUGGAGUCUGUA	UACAGACUCCAGGGCUCCA	1786-1808

Результаты этих анализов in vitro представлены в табл.16. В табл.16 также указаны целевые виды каждой из siRNA.

Таблица 16. Результаты функциональных анализов

				дное погло			Трансфе	кция для		фекция
				крабоедов			макак-крабоедов		He	p3b
ID	Целевые		1 MKM,		20 нМ,	1	20 HM,	0,2 нМ,	10 HM,	0,1 нМ,
дуплекса	виды	Тип	средн.	500 HM	средн.	10 HM	средн.	средн.	средн.	средн.
	M/R/Rh/									
AD-58848	н	21/23	131,6	176,0	104,4	128,0	43,5	44,8	25,3	76,8
AD-58849	H/Rh	21/23	91,9	88,1	92,2	105,0	29,4	35,4	11,5	47,1
AD-58850	H/Rh	21/23	79,4	103,4	80,0	111,2	н.д.	62,2	31,3	72,0
AD-58851	H/Rh	21/23	99,7	74,7	94,8	104,7	н.д.	40,7	8,6	81,3
AD-58852	H/Rh	21/23	108,1	91,8	103,3	111,9	101,1	128,8	43,4	129,0
AD-58853	H/Rh	21/23	74,8	67,7	84,2	93,5	24,7	52,9	14,1	61,2
AD-58854	H/Rh	21/23	145,9	124,1	106,6	115,3	119,0	83,9	85,0	84,0
AD-58855	H/Rh	21/23	81,5	97,9	92,7	101,8	39,5	40,3	15,3	67,6
AD-58856	H/Rh	21/23	74,1	90,6	84,6	82,6	22,4	30,7	8,7	33,3
AD-58857	H/Rh	21/23	64,7	91,4	62,3	87,1	22,0	31,6	9,8	106,3
AD-58858	H/Rh	21/23	67,4	91,7	68,6	98,3	27,9	40,3	17,4	44,8
AD-58859	H/Rh	21/23	71,2	77,2	92,4	90,1	19,1	34,3	13,1	39,7
AD-58861	H/Rh	21/23	104,6	107,2	102,0	100,6	25,9	35,1	18,0	69,8
AD-58862	H/Rh	21/23	66,8	77,0	68,7	88,5	20,3	31,1	24,2	49,9
AD-58863	H/Rh	21/23	70,8	66,8	76,8	98,5	21,5	29,7	8,7	54,9
AD-58864	H/Rh	21/23	76,2	85,6	83,7	100,8	60,4	61,0	56,4	87,3
AD-58865	H/Rh	21/23	67,9	77,9	95,9	98,4	21,3	38,6	15,5	81,4
AD-58867	H/Rh	21/23	95,9	93,3	107,0	97,5	32,3	42,7	16,6	79,8
AD-58868	H/Rh	21/23	95,2	92,1	116,2	94,7	54,6	69,2	61,5	105,9
AD-58869	H/Rh	21/23	65,0	78,2	75,8	88,2	17,4	25,0	13,0	63,9
AD-58870	H/Rh	21/23	69,4	92,3	81,0	88,1	29,2	43,8	33,7	79,1
AD-58871	H/Rh	21/23	61,2	77,3	88,2	77,0	71,2	73,2	36,7	110,3
AD-58873	H/Rh	21/23	95,2	100,9	83,3	94,6	54,2	52,8	36,6	73,3
AD-58874	H/Rh	21/23	75,8	76,8	63,8	85,3	22,3	31,2	15,0	38,2
AD-58875	H/Rh	21/23	80,7	88,7	78,6	97,9	48,6	73,6	61,2	90,6
AD-58876	H/Rh	21/23	90,8	93,1	82,5	100,2	41,1	56,9	21,2	58,7
AD-58877	H/Rh	21/23	68,3	85,1	51,2	78,7	18,5	46,6	11,9	27,4
AD-58878	H/Rh	21/23	78,3	68,3	81,2	91,2	24,1	23,4	6,2	37,1
AD-58879	H/Rh	21/23	87,9	94,1	79,7	95,4	32,0	47,8	15,7	82,5
AD-58880	H/Rh	21/23	74,9	72,2	88,9	88,1	20,1	27,5	14,0	60,7
AD-58881	H/Rh	21/23	85,9	76,8	78,8	118,0	22,2	36,7	27,6	71,6
AD-58882	H/Rh	21/23	54,1	53,4	60,3	85,8	14,6	27,2	8,2	23,8
AD-58883	H/Rh	21/23	80,4	69,9	75,7	80,3	31,8	25,8	12,3	63,0
AD-58884	H/Rh	21/23	57,7	55,3	64,8	78,2	20,0	30,0	11,8	68,9
AD-58885	H/Rh	21/23	101,8	91,8	104,1	101,5	85,9	71,9	61,8	71,2
	M/R/Rh/									
AD-58886	Н	21/23	47,1	58,0	36,3	93,3	16,0	26,6	9,2	32,0
AD-58887	H/Rh	21/23	73,6	98,7	82,6	95,2	28,5	33,5	12,8	65,2
AD-58888	H/Rh	21/23	90,2	69,9	69,4	85,6	46,9	45,0	16,6	72,0
AD-58889	H/Rh	21/23	83,6	98,6	82,4	92,2	36,5	40,3	31,6	99,4
AD-58890	H/Rh	21/23	69,5	95,4	84,2	88,2	50,8	45,6	21,7	92,9

AD-58891	H/Rh	21/23	62,8	75,7	75,4	109,2	23,6	34,3	15,6	55,8
AD-58892	H/Rh	21/23	60,2	92,9	89,8	92,9	22,8	43,3	20,2	75,6
AD-59095	M/R/Rh/ H	19me r	88,9	н.д.	132,8	н.д.	48,3	97,4	54,3	99,0
715 03033	M/R/Rh/	19me	00,5		202,0		10,0	37,1	5 1,5	33,0
AD-59096	H M/R/Rh/	r 19me	95,5	н.д.	90,5	н.д.	105,7	138,6	131,4	120,7
AD-59097	H	r	92,5	н.д.	84,2	н.д.	75,0	н.д.	94,7	108,5
AD 50000	M/R/Rh/	19me	04.0		07.7		100.3		120.0	07.3
AD-59098	M/R/Rh/	r 19me	84,0	н.д.	87,7	н.д.	109,3	н.д.	130,0	87,3
AD-59099	Н	r	89,7	н.д.	90,0	н.д.	77,8	85,4	46,8	74,9
AD-59100	M/R/Rh/ H	19me r	84,8	н.д.	144,3	н.д.	70,6	108,1	91,5	117,6
	M/R/Rh/	19me								
AD-59101	M/R/Rh/	r 19me	79,0	н.д.	103,8	н.д.	89,8	102,9	124,2	107,0
AD-59102	Н	r	85,9	н.д.	100,6	н.д.	72,2	68,5	87,9	95,1
AD-59103	M/R/Rh/ H	19me r	86,0		91,1		93,0	81,3	130,0	96,0
AD-35103	M/R/Rh/	19me	80,0	н.д.	91,1	н.д.	93,0	61,5	130,0	30,0
AD-59104	H	r	92,6	н.д.	96,9	н.д.	94,9	91,4	124,4	83,1
AD-59105	M/R/Rh/ H	19me r	48,9	н.д.	101,7	н.д.	18,4	48,9	17,0	34,7
15 50105	M/R/Rh/	19me	62.2		76.7		20.5	40.7	20.5	45.4
AD-59106	M/R/Rh/	r 19me	63,2	н.д.	76,7	н.д.	28,5	40,7	28,6	46,4
AD-59107	Н	r	71,4	н.д.	68,7	н.д.	37,1	45,3	26,8	63,6
AD-59108	M/R/Rh/ H	19me r	70,7	н.д.	85,1	н.д.	89,9	84,8	139,2	101,7
	M/R/Rh/	19me	70,7			П.Д.		04,0	133,2	101,7
AD-59109	H M/R/Rh/	r 19me	86,1	н.д.	83,4	н.д.	84,9	96,2	131,7	86,7
AD-59110	H	r	70,8	н.д.	119,7	н.д.	38,5	60,4	67,4	80,3
AD-59111	M/R/Rh/ H	19me	66,1		76,5		52,2	61,0	69,7	87,6
AD-39111	M/R/Rh/	19me	66,1	н.д.	76,3	н.д.	32,2	61,0	09,7	87,0
AD-59112	H	r	71,2	н.д.	80,2	н.д.	91,2	83,4	127,4	89,0
AD-59113	M/R/Rh/ H	19me r	67,0	н.д.	77,8	н.д.	49,1	59,0	66,8	91,4
	M/R/Rh/	19me								
AD-59114	M/R/Rh/	19me	81,7	н.д.	79,3	н.д.	96,3	88,0	129,6	72,4
AD-59115	Н	r	40,4	н.д.	69,6	н.д.	19,6	35,7	9,3	16,9
AD-59116	M/R/Rh/ H	19me r	72,2	н.д.	78,3	н.д.	53,5	77,8	70,1	107,8
	M/R/Rh/	19me								
AD-59117	M/R/Rh/	r 19me	70,7	н.д.	75,6	н.д.	75,8	74,9	129,0	103,5
AD-59118	Н	r	68,8	н.д.	75,9	н.д.	81,4	82,1	114,1	89,7
AD-59119	M/R/Rh/ H	19me r	64,9	н.д.	86,5	н.д.	85,1	125,1	122,8	124,8
	M/R/Rh/	19me								
AD-59120	H M/R/Rh/	r 19me	63,5	н.д.	75,1	н.д.	29,9	52,0	16,1	54,1
AD-59121	H	r	67,6	н.д.	72,0	н.д.	88,8	77,4	108,0	103,1
	M/R/Rh/	19me								
AD-59122	H M/R/Rh/	r 19me	60,2	н.д.	62,3	н.д.	25,1	45,3	16,2	54,8
AD-59123	Н	r	68,6	н.д.	108,2	н.д.	59,2	84,6	80,0	97,7
AD E0134	M/R/Rh/	19me	47 F		56.5		22.0	40.0		10.0
AD-59124	M/R/Rh/	r 19me	47,5	н.д.	56,5	н.д.	23,9	40,0	9,8	18,9
AD-59125	H MA/D/Dh/	r 10	45,4	н.д.	47,2	н.д.	15,2	40,7	14,7	15,1
AD-59126	M/R/Rh/ H	19me r	64,3	н.д.	74,6	н.д.	51,6	57,1	35,5	54,4
	M/R/Rh/	19me								
AD-59127	M/R/Rh/	r 19me	103,4	н.д.	105,8	н.д.	94,0	156,4	135,9	113,7
AD-59128	Н	r	102,4	н.д.	81,4	н.д.	66,3	89,3	60,2	74,9
AD-59129	M/R/Rh/ H	19me r	41,3	н.д.	38,8	н.д.	17,9	41,4	8,6	12,6
	M/R/Rh/	19me		Тд.		Тд.				
AD-59130	Н	r	58,3	н.д.	80,8	н.д.	94,9	78,3	106,7	88,0

В табл. 17 показаны  $IC_{50}$  отдельных дуплексов siRNA ALAS1. IC50 определяли в результате нокдауна эндогенно экспрессируемой ALAS1 в клеточной линии Hep3B через 24 ч после трансфекции каждого модифицированного ALAS1 дуплекса siRNA (см. табл.4). По меньшей мере семь дуплексов, в том числе AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856 и AD-59129, неизменно проявляли  $IC_{50}$  менее 0,1 нм, указывая на то, что эти дуплексы были особенно эффективными в подавлении экспрессии ALAS1.

Таблица 17. IC<sub>50</sub> отдельных дуплексов siRNA ALAS1

ID дуплекса	384w IC <sub>50</sub> (нM)	96w IC <sub>50</sub> (нМ)
AD-58882	0,008	0,014
AD-58878	0,040	0,031
AD-58886	0,037	0,033
AD-58877	0,031	0,034
AD-59115	0,093	0,052
AD-58856	0,061	0,066
AD-59129	0,085	0,071
AD-59124	0,572	0,078
AD-58874	0,140	0,102
AD-59125	0,118	0,115
AD-59105	0,511	0,144
AD-59120	180,592	0,498
AD-59122	36,646	0,646
AD-59106	7,906	0,847
AD-59126	н.д.	1,014
AD-59107	н.д.	1,971

Пример 11. Активность ALAS1-GalNAc в мышиной модели при индукции AIP фенобарбиталом Мышиную модель AIP использовали для исследования эффекта siRNA, которая представляла собой конъюгат ALAS1-GalNAc. siRNA характеризовалась последовательностью дуплекса AD-58632 (см. табл. 20).

Таблица 20. Последовательности дуплекса AD-58632 с siRNA ALAS1

SEQ ID NO: (смысловая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
4149	4150	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUf CfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg

Мышей с AIP не обрабатывали (исходный уровень) или им вводили подкожно на 1 день солевой раствор или конъюгат ALAS1-GalNAc в количестве 20 мг/кг. На 2, 3 и 4 дни их оставляли необработанными (исходный уровень) или им вводили интраперитонеально инъекции фенобарбитала. На 5 день забирали плазму и измеряли уровни ALA и PBG с использованием анализа LC-MS. Как показано на фиг. 15, конъюгат ALAS1-GalNAc снижал образование ALA и PBG в плазме приблизительно на 84 и 80% соответственно. По данным результатам видно, что обработка конъюгатом ALAS1-GalNAc была эффективной в предупреждении повышений уровней как ALA, так и PBG в плазме, связанных с индуцированными фенобарбиталом острыми приступами в этой животной модели AIP.

Пример 12. Дополнительные siRNA, которые нацелены на ALAS1 и ингибируют экспрессию ALAS1

Конструировали модифицированные последовательности siRNA, которые нацеливают siRNA ALAS1, и получали их, как описано в примере 2. Последовательности представлены в табл. 18. Активность in vitro модифицированных дуплексов исследовали, как описано ниже.

Таблица 18. Модифицированные последовательности одиночных нитей и дуплексов ALAS1 человека

SEQ ID	SEQID	Названи	Смысловая	Антисмысловая	Целевые сайты
NO:	NO: (анти-	е	последовательность	последовательность	антисмысловой
(смысло	смыслова	дуплекс	(5'-3')	(5'-3')	последовательн
вая)	я)	a			ости
		AD-	CAGGCAAAUCUCUGUUGUUdT	AACAACAGAGAUUUGCCUGdT	NM_000688.4 402-420
3685	3686	59453	dT	dT	402-420
		AD-	GAAAAAAUUGAUGAGAAAdT	UUUCUCAUCAAUUUUUUUCdT	949-967
3687	3688	59395	dT	dT	
3680	2600	AD-	GGAAAGAUGCCGCACUCUUdT dT	AAGAGUGCGGCAUCUUUCCdT dT	1242-1260
3689	3690	59477 AD-	UGUCUCAUCUUCUUCAAGAdT	UCUUGAAGAAGAUGAGACAdT	882-900
3691	3692	59492	dT	dT	002 300
		AD-	ACAUCUACGUGCAAGCAAUdT	AUUGCUUGCACGUAGAUGUdT	1992-2010
3693	3694	59361	dT	dT	4744 4770
3695	3696	AD- 59462	UUCUCUGAUUGACACCGUAdT dT	UACGGUGUCAAUCAGAGAAdT dT	1711-1729
3033	3030	AD-	GCUGCUGGCUUCAUCUUCAdT	UGAAGAUGAAGCCAGCAGCdT	1739-1757
3697	3698	59433	dT	dT	
		AD-	AGCGCAACGUCAAACUCAUdT	AUGAGUUUGACGUUGCGCUd	1851-1869
3699	3700	59424 AD-	dT UAUUUCUGGAACUAGUAAAd	TdT UUUACUAGUUCCAGAAAUAdT	1183-1201
3701	3702	59414	TdT	dT	1103-1201
		AD-	GGUUGUGUUGGAGGGUACAd	UGUACCCUCCAACACAACCdTd	1679-1697
3703	3704	59539	TdT	T	
2705	2706	AD- 59400	GUGUCAGUCUGGUGCAGUAd TdT	UACUGCACCAGACUGACACdTd	1070-1088
3705	3706	AD-	CUUUGUGGCCAAUGACUCAdT	UGAGUCAUUGGCCACAAAGdT	1273-1291
3707	3708	59551	dT	dT	
		AD-	AGAUGCUGCUAAAAACACAdT	UGUGUUUUUAGCAGCAUCUd	1942-1960
3709	3710	59482	dT	TdT	
		AD-	GAGUCAUGCCAAAAAUGGAdT	UCCAUUUUUGGCAUGACUCdT	1629-1647
3711	3712	59448	dT	dΤ	
		AD-	CUGUGCGGAUCCUGAAGAGdT	CUCUUCAGGAUCCGCACAGdT	1800-1818
3713	3714	59392	dT CACUUUGAAACAACAUGGUdT	ACCALICITICAL TO THE TOTAL TOT	1141 1150
3715	3716	AD- 59469	dT	ACCAUGUUGUUUCAAAGUGdT dT	1141-1159
5725	0720	AD-	AAGUGAUGAGUGAAAGAGAd	UCUCUUUCACUCAUCACUUdT	2193-2211
3717	3718	59431	TdT	dT	
		AD-	AUCUGCUAGUCACAUGGAAdT	UUCCAUGUGACUAGCAGAUdT	2103-2121
3719	3720	59423 AD-	dT UGGGGCAGGUGGUACUAGAd	UCUAGUACCACCUGCCCCAdTd	1162-1180
3721	3722	59517	TdT	T	1102-1180
		AD-	GCAGAUGACUAUUCAGACUdT	AGUCUGAAUAGUCAUCUGCdT	1031-1049
3723	3724	59578	dT	dT	
3725	3726	AD- 59495	GCCUCAUUCCUCAGCUGAGdT dT	CUCAGCUGAGGAAUGAGGCdT dT	2143-2161
3/23	3720	AD-	GUAUGAUCGUUUCUUUGAGd	CUCAAAGAAACGAUCAUACdT	931-949
3727	3728	59432	TdT	dT	332 3 13
		AD-	UAUCCAGAUGGUCUUCAGAdT	UCUGAAGACCAUCUGGAUAdT	2302-2320
3729	3730	59382	dT	dT	700.047
3731	3732	AD- 59472	UAGUGUGAAAACCGAUGGAdT dT	UCCAUCGGUUUUCACACUAdT dT	799-817
3/31	3/32	AD-	UCCCCAUGGCAGAUGACUAdT	UAGUCAUCUGCCAUGGGGAdT	1023-1041
3733	3734	59459	dT	dT	
		AD-	CCACUGCAGCAGUACACUAdT	UAGUGUACUGCUGCAGUGGd	483-501
3735	3736	59413	dT CUGUGAACCGGCGAGCACAdT	TdT UGUGCUCGCCGGUUCACAGdT	999-1017
3737	3738	AD- 59478	dT	dT	333-1017
		AD-	GGUCCUAUGCUGCUGGCUUd	AAGCCAGCAGCAUAGGACCdTd	1731-1749
3739	3740	59376	TdT	Т	
27/11	37/12	AD-	AGCCUUUGGUUGUGUUGGAd	UCCAACACAACCAAAGGCUdTd T	1672-1690
3741	3742	59556 AD-	TdT AAUUCCAUGUGGACUUAGAdT	UCUAAGUCCACAUGGAAUUdT	1200-1218
3743	3744	59399	dT	dT	
		AD-	CCAGGGCACUGCAAGCAAAdT	UUUGCUUGCAGUGCCCUGGdT	640-658
3745	3746	59474	dT	dT	034 043
3747	3748	AD- 53542	cuuuucAGuAuGAucGuuudTsd T	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTs dT	924-942
3,77	3770	AD-	GAAUCAGAGAGGCAGCAGUdT	ACUGCUGCCUCUCUGAUUCdT	682-700
3749	3750	59480	dT	dΤ	
	l	AD-	GCAAAGAUCUGACCCCUCAdT	UGAGGGGUCAGAUCUUUGCd	1441-1459
3751	3752	59549	CCACAACACCUCCUACCCAdT	TdT	2022 2051
3753	3754	AD- 59515	GGAGAAGAGCUCCUACGGAdT   dT	UCCGUAGGAGCUCUUCUCCdT dT	2033-2051
5.55	5.57	AD-	CCAUGAGUUUGGAGCAAUCdT	GAUUGCUCCAAACUCAUGGdT	1540-1558
3755	3756	59427	dT	dT	
2757	2750	AD-	CUUUGAGAAAAAAAUUGAUdT	AUCAAUUUUUUUCUCAAAGdT	943-961
3757	3758	59390 AD-	dT UGAGCAGACAUAACAUCUAdT	dT UAGAUGUUAUGUCUGCUCAdT	1980-1998
3759	3760	59511	dT	dT	1300-1330
		AD-	CGUGCAAGCAAUCAAUUACdT	GUAAUUGAUUGCUUGCACGdT	1999-2017
3761	3762	59532	dT	dT	
3762	3764	AD-	AAAGCAAAGACCAGAAAGAdT dT	UCUUUCUGGUCUUUGCUUUd TdT	862-880
3763	3764	59562 AD-	GGAUGUGCAGGAAAUGAAUd	AUUCAUUUCCUGCACAUCCdT	733-751
3765	3766	59513	TdT	dT	
	•				

	1	LAD	CACCALLACILLICCLICAACALLIT	MICHICACCAACHAHCCHCA	224 220
3767	3768	AD- 59362	CAGCAUACUUCCUGAACAUdT	AUGUUCAGGAAGUAUGCUGd TdT	321-339
		AD-	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsd	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdT	671-689
3769	3770	53541	T	sdT	0,1 003
		AD-	UCUGUUGUUCUAUGCCCAAdT	UUGGGCAUAGAACAACAGAdT	412-430
3771	3772	59490	dT	dT	
		AD-	UGAGACAGAUGCUAAUGGAdT	UCCAUUAGCAUCUGUCUCAdT	1869-1887
3773	3774	59422	dT	dT	
		AD-	GCCAAUGACUCAACCCUCUdT	AGAGGGUUGAGUCAUUGGCd	1280-1298
3775	3776	59467	dT	TdT	
		AD-	GAGUGCAACUUCUGCAGGAdT	UCCUGCAGAAGUUGCACUCdT	2159-2177
3777	3778	59579	dT	dT	
		AD-	GUGAAAGAGAGAGUCCUAdT	UAGGACUUCUCUCUUUCACdT	2202-2220
3779	3780	59426	dT	dT	
		AD-	UAACUUGCCAAAAUCUGUUdT	AACAGAUUUUGGCAAGUUAdT	901-919
3781	3782	59363	dT	dT	
		AD-	AAGCCAGUCUUGAGCUUCAdT	UGAAGCUCAAGACUGGCUUdT	711-729
3783	3784	59436	dT	dT	
		AD-	cAcuuuucAGuAuGAucGudTsd	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTs	922-940
3785	3786	53536	Т	dT	
		AD-	GCAGCAGUGUCUUCUGCAAdT	UUGCAGAAGACACUGCUGCdT	693-711
3787	3788	59491	dT	dT	
		AD-	UCCUGAACAUGGAGAGUGUdT	ACACUCUCCAUGUUCAGGAdT	330-348
3789	3790	59500	dT	dT	
		AD-	AUUUCUGGAACACUUGGCAdT	UGCCAAGUGUUCCAGAAAUdT	1652-1670
3791	3792	59394	dT	dT	
		AD-	CAGUACACUACCAACAGAUdT	AUCUGUUGGUAGUGUACUGd	492-510
3793	3794	59441	dT	TdT	
		AD-	GCAUGACCUCAAUUAUUUCdT	GAAAUAAUUGAGGUCAUGCdT	2261-2279
3795	3796	59365	dT	dT	
		AD-	AGAACUGCUGCAAAGAUCUdT	AGAUCUUUGCAGCAGUUCUdT	1432-1450
3797	3798	59411	dT	dT	
		AD-	CACCCCAGAUGAUGAACUAdT	UAGUUCAUCAUCUGGGGUGd	2073-2091
3799	3800	59544	dT	TdT	
		AD-	GAUCCAAGGGAUUCGAAACdT	GUUUCGAAUCCCUUGGAUCdT	1363-1381
3801	3802	59428	dT	dT	
		AD-	CUCAUCACCAAAAAGCAAGdTd	CUUGCUUUUUGGUGAUGAGd	1052-1070
3803	3804	59471	Т	TdT	
		AD-	ACAACAUGGUGCUGGGGCAdT	UGCCCCAGCACCAUGUUGUdT	1150-1168
3805	3806	59518	dT	dT	
		AD-	GAucGuuucuuuGAGAAAAdTsd	UUUUCUcAAAGAAACGAUCdTs	935-953
3807	3808	53547	Т	dT	
		AD-	CAGCACGAGUUCUCUGAUUdT	AAUCAGAGAACUCGUGCUGdT	1702-1720
3809	3810	59573	dT	dT	
	1 -	AD-	AAUGAUGUCAGCCACCUCAdT	UGAGGUGGCUGACAUCAUUdT	1412-1430
3811	3812	59473	dT	dT	
	1	AD-	AGUUAUGGACACUUUGAAAdT	UUUCAAAGUGUCCAUAACUdT	1132-1150
3813	3814	59412	dT	dT	
	1	AD-	GAUGAUGAACUACUUCCUUdT	AAGGAAGUAGUUCAUCAUCdT	2080-2098
3815	3816	59522	dT	dT	
	1	AD-	GCAGGAAAUGAAUGCCGUGdT	CACGGCAUUCAUUUCCUGCdT	739-757
3817	3818	59502	dT	dT	
	1	AD-	UCUUCAAGAUAACUUGCCAdT	UGGCAAGUUAUCUUGAAGAdT	892-910
3819	3820	59499	dT	dT	
-	15020	AD-	CGAUGGAGGGAUCCCAGUdT	ACUGGGAUCCCCUCCAUCGdT	811-829
3821	3822	59520	dT	dT	011-025
7021	1 3022	1 33320	1 41	I 41	l

		AD-	CCAAAAAGCAAGUGUCAGUdT	ACUGACACUUGCUUUUUGGdT	1059-1077
3823	3824	59581	dT	dT	
3825	3826	AD- 59461	GAUUGGGGAUCGGAUGGAd TdT	UCCAUCCCGAUCCCCAAUCdTd T	1612-1630
3827	3828	AD- 59370	CCCUGGAGUCUGUGCGGAUdT dT	AUCCGCACAGACUCCAGGGdT dT	1791-1809
5027	5020	AD-	GuuGucuuuAuAuGuGAAudTsd	AUUcAcAuAuAAAGAcAACdTsd	2321-2339
3829	3830	53540	Т	Т	
		AD-	CGGGCAUUGUCCACUGCAGdT	CUGCAGUGGACAAUGCCCGdT	473-491
3831	3832	59574	dT	dT	
		AD-	UAUUCAGACUCCCUCAUCAdT	UGAUGAGGGAGUCUGAAUAd	1040-1058
3833	3834	59375	dT	TdT	
		AD-	CACUGCAUUUUGAAGUGAUd	AUCACUUCAAAAUGCAGUGdT	2181-2199
3835	3836	59387	TdT	dT	
		AD-	CCAGAAAGAGUGUCUCAUCdT	GAUGAGACACUCUUUCUGGdT	872-890
3837	3838	59397	dT	dT	
		AD-	AGGCGGAGGGAUUGGGGAUd	AUCCCCAAUCCCUCCGCCUdTd	1603-1621
3839	3840	59396	TdT	Т	
		AD-	AGACCUCCAUGGGAAAGAUdT	AUCUUUCCCAUGGAGGUCUdT	1231-1249
3841	3842	59393	dT	dT	
		AD-	GCAGGAGGCCACUGCAUUUdT	AAAUGCAGUGGCCUCCUGCdT	2172-2190
3843	3844	59483	dT	dT	
	l	AD-	AUCUGUUUCCACUUUUCAGdT	CUGAAAAGUGGAAACAGAUdT	913-931
3845	3846	59430	dT	dT	
		AD-	AGAGAAGUCCUAUUUCUCAdT	UGAGAAAUAGGACUUCUCUdT	2209-2227
3847	3848	59463	dT	dT	
		AD-	GucuucAGAGuuGucuuuAdTsd	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTs	2312-2330
3849	3850	53534	T	dT	2422 2442
2054	2052	AD-	GGCUGGAACUGAAGCCUCAdT	UGAGGCUUCAGUUCCAGCCdT	2130-2148
3851	3852	59514	dT	dT	2202 2240
2052	2054	AD-	GCCAUUAUCAUAUCCAGAUdT	AUCUGGAUAUGAUAAUGGCdT	2292-2310
3853	3854	59575 AD-	dT AGCAGGCCCCAGUGUGGUUdT	dT AACCACACUGGGGCCUGCUdT	781-799
3855	3856	59364	dT	dT	/81-/99
3633	3830	AD-	UCAGCUGAGUGCAACUUCUdT	AGAAGUUGCACUCAGCUGAdT	2153-2171
3857	3858	59402	dT	dT	2133 21/1
3037	3030	AD-	GAGCACACAUCUUCCCCAUdT	AUGGGGAAGAUGUGUGCUCd	1011-1029
3859	3860	59479	dT	TdT	1011 1025
		AD-	ACUUCCAGGACAUCAUGCAdT	UGCAUGAUGUCCUGGAAGUdT	843-861
3861	3862	59481	dT	dT	0.0002
		AD-	CCUAUCGAGUUUUUAAAACdT	GUUUUAAAAACUCGAUAGGdT	981-999
3863	3864	59530	dT	dT	
		AD-	CUUCCUUGAGAAUCUGCUAdT	UAGCAGAUUCUCAAGGAAGdT	2092-2110
3865	3866	59582	dT	dT	
		AD-	ACCAACAGAUCAAAGAAACdTd	GUUUCUUUGAUCUGUUGGUd	501-519
3867	3868	59506	Т	TdT	
		AD-	UAACCCCAGGCCAUUAUCAdT	UGAUAAUGGCCUGGGGUUAd	2283-2301
3869	3870	59567	dT	TdT	
		AD-	CCAUGCCUCCAUGAUCCAAdT	UUGGAUCAUGGAGGCAUGGd	1351-1369
3871	3872	59485	dT	TdT	
		AD-	UGAUGAACUAAUGAGCAGAdT	UCUGCUCAUUAGUUCAUCAdT	1969-1987
3873	3874	59525	dT	dT	
		AD-	CCUGAAGAGCGCUGAGGGAdT	UCCCUCAGCGCUCUUCAGGdT	1810-1828
3875	3876	59566	dT	dT	
		AD-	AACACUUGGCAAAGCCUUUdT	AAAGGCUUUGCCAAGUGUUdT	1660-1678
3877	3878	59580	dT	dT	

		AD-	UCUGCAGAAAGCAGGCAAAdT	UUUGCCUGCUUUCUGCAGAdT	391-409
3879	3880	59512	dT	dT	391-409
3673	3680	AD-	CCGGCCUCCCUGUUGUCCAdT	UGGACAACAGGGAGGCCGGdT	1890-1908
3881	3882	59475	dT	dT	1890-1908
	1002	AD-	CAUCAUCCCUGUGCGGGUUdT	AACCCGCACAGGGAUGAUGdT	1921-1939
3883	3884	59438	dT	dT	
		AD-	UGUGCGGGUUGCAGAUGCUd	AGCAUCUGCAACCCGCACAdTd	1930-1948
3885	3886	59442	TdT	Т	
		AD-	GGAAAGAGGUUGCUGAAACdT	GUUUCAGCAACCUCUUUCCdT	759-777
3887	3888	59516	dT	dT	
		AD-	AGGUCCACGCAGUGGGGCUdT	AGCCCCACUGCGUGGACCUdT	1572-1590
3889	3890	59429	dT	dT	
		AD-	UGCCGUGAGGAAAGAGGUUd	AACCUCUUUCCUCACGGCAdTd	751-769
3891	3892	59510	TdT	Т	
		AD-	GCUAAUGGAUGCCGGCCUCdT	GAGGCCGGCAUCCAUUAGCdT	1879-1897
3893	3894	59457	dT	dT	2440 2427
2005	3800	AD-	GAAGCAAGUGGGGCUGGAAd	UUCCAGCCCCACUUGCUUCdT	2119-2137
3895	3896	59434 AD-	TdT CAUCUUCCGCCACAAUGAUdT	dT AUCAUUGUGGCGGAAGAUGd	1399-1417
3897	3898	59454	dT	TdT	1599-1417
3637	3696	AD-	AUUUCUCAGGCUUGAGCAAdT	UUGCUCAAGCCUGAGAAAUdT	2220-2238
3899	3900	59468	dT	dT	2220-2236
3033	3300	AD-	CCCGAGUCCCCCAGGCCUUdTd	AAGGCCUGGGGGACUCGGGdT	372-390
3901	3902	59565	Т	dT	
		AD-	CAAGCAAAUGCCCUUUCCUdT	AGGAAAGGGCAUUUGCUUGd	651-669
3903	3904	59416	dT	TdT	
		AD-	CCCCUCAGUCCCCAAGAUUdTd	AAUCUUGGGGACUGAGGGGd	1453-1471
3905	3906	59420	Т	TdT	
		AD-	CUACGGUGCCCCGGGGAGAdT	UCUCCCCGGGGCACCGUAGdT	2019-2037
3907	3908	59552	dT	dT	
		AD-	AAAACUGCCCCAAGAUGAUdT	AUCAUCUUGGGGCAGUUUUd	429-447
3909	3910	59558	dT	TdT	
		AD-	ACAAAACUGCUAAGGCCAAdT	UUGGCCUUAGCAGUUUUGUd	540-558
3911	3912	59404 AD-	The control of the con	TdT	1240 1250
3913	3914	59455	GAUUCUGGGAACCAUGCCUdT dT	AGGCAUGGUUCCCAGAAUCdT dT	1340-1358
2912	3914	AD-	CCAGAUGGCACACAGCUUCdT	GAAGCUGUGUGCCAUCUGGdT	593-611
3915	3916	59496	dT	dT	393-011
3313	3310	AD-	AGGGAUUCGAAACAGCCGAdT	UCGGCUGUUUCGAAUCCCUdT	1369-1387
3917	3918	59446	dT	dT	1303 1307
	1	AD-	CUCUGCAGUCCUCAGCGCAdT	UGCGCUGAGGACUGCAGAGdT	109-127
3919	3920	59435	dΤ	dT	
		AD-	CCGCCGCCUCUGCAGUCCUdT	AGGACUGCAGAGGCGGCGGdT	102-120
3921	3922	59419	dT	dT	
		AD-	CUGGCUGGAGCCCUGGAGUdT	ACUCCAGGGCUCCAGCCAGdTd	1781-1799
3923	3924	59533	dT	Т	
		AD-	GACAUCAUGCAAAAGCAAAdT	UUUGCUUUUGCAUGAUGUCd	851-869
3925	3926	59366	dT	TdT	
		AD-	GCUUGAGCAAGUUGGUAUCd	GAUACCAACUUGCUCAAGCdT	2229-2247
3927	3928	59521	TdT	dT	4220 4220
2020	2020	AD-	CAGGCUGUGAGAUUUACUCdT	GAGUAAAUCUCACAGCCUGdT	1320-1338
3929	3930	59563	dT Tb	CCCCACALICACACACCIICILIATA	1522 1540
3931	3932	AD- 59534	AGAGCUGUGUGAUGUGGCCd	GGCCACAUCACACAGCUCUdTd T	1522-1540
3931	3932	AD-	GGAGCUGGCAGACCUCCAUdT	AUGGAGGUCUGCCAGCUCCdT	1222-1240
3933	3934	59407	dT	dT	1222-1240
3333	3334	33407	T 41	[ ui	l

	1	T 4.D	ALICCOACHECACHECHEAAIT	LILICA COA CUCCA CUCCCA LLIT	022.040
3935	3936	AD- 59445	AUCCCAGUGGACUGCUGAAdT dT	UUCAGCAGUCCACUGGGAUdT dT	822-840
3333	3930	AD-	GUCAAACUCAUGAGACAGAdT	UCUGUCUCAUGAGUUUGACdT	1859-1877
3937	3938	59546	dT	dT	1033-1077
3337	3330	AD-	CUUUCCUGGCAGCACAGAUdT	AUCUGUGCUGCCAGGAAAGdT	663-681
3939	3940	59456	dT	dT	000 002
		AD-	CCCUCCGGCCAGUGAGAAAdT	UUUCUCACUGGCCGGAGGGdT	520-538
3941	3942	59503	dT	dT	
		AD-	CUACCUAGGAAUGAGUCGCdT	GCGACUCAUUCCUAGGUAGdT	1093-1111
3943	3944	59536	dT	dT	
		AD-	CCCAAGAUUGUGGCAUUUGdT	CAAAUGCCACAAUCUUGGGdT	1463-1481
3945	3946	59385	dT	dT	
		AD-	GAGCAAUCACCUUCGUGGAdT	UCCACGAAGGUGAUUGCUCdT	1551-1569
3947	3948	59367	dT	dT	
		AD-	UGCCCAUUCUUAUCCCGAGdT	CUCGGGAUAAGAAUGGGCAdT	359-377
3949	3950	59458	dT	dT	
		AD-	AAGGCCAAGGUCCAACAGAdT	UCUGUUGGACCUUGGCCUUdT	551-569
3951	3952	59381	dT	dT	
		AD-	CACACAGCUUCCGUCUGGAdT	UCCAGACGGAAGCUGUGUGdT	601-619
3953	3954	59538	dT	dT	4504 4600
2055	2056	AD-	UUAUGGGGCUCGAGGCGGAd	UCCGCCUCGAGCCCCAUAAdTd	1591-1609
3955	3956	59421	TdT	T ACUSCOUNISCACAGO AT	700 710
3957	3958	AD- 59388	UGUCUUCUGCAAAGCCAGUdT dT	ACUGGCUUUGCAGAAGACAdT dT	700-718
3337	3936	AD-	AGGCCUGAGCAUGACCUCAdT	UGAGGUCAUGCUCAGGCCUdT	2253-2271
3959	3960	59444	dT	dT	2233-22/1
3333	3300	AD-	AUGUGAAUUAAGUUAUAUUd	AAUAUAACUUAAUUCACAUdT	2332-2350
3961	3962	59528	TdT	dT	2552-2550
0000		AD-	ACUGCUGAAGAACUUCCAGdT	CUGGAAGUUCUUCAGCAGUdT	832-850
3963	3964	59498	dT	dT	
		AD-	UGAGAAAGACAAAACUGCUdT	AGCAGUUUUGUCUUUCUCAdT	532-550
3965	3966	59497	dT	dT	
		AD-	UCAGCCACCUCAGAGAACUdT	AGUUCUCUGAGGUGGCUGAd	1419-1437
3967	3968	59384	dT	TdT	
		AD-	GGCAACGAGCGUUUCGUUUd	AAACGAAACGCUCGUUGCCdT	51-69
3969	3970	59452	TdT	dT	
		AD-	CCUGAUGGAUCCCAGCAGAdT	UCUGCUGGGAUCCAUCAGGdT	572-590
3971	3972	59379	dT	dT	
	1	AD-	UGUGCCCACUGGAAGAGCUdT	AGCUCUUCCAGUGGGCACAdT	1509-1527
3973	3974	59529	dT	dT	
2075	2076	AD-	CCACAGGAGCCAGCAUACUdT	AGUAUGCUGGCUCCUGUGGdT	311-329
3975	3976	59389	dT	dT	1170 1100
3977	3978	AD- 59585	GUGGUACUAGAAAUAUUUCd TdT	GAAAUAUUUCUAGUACCACdT dT	1170-1188
39//	39/0	AD-	UUCGCCGCUGCCCAUUCUUdT	AAGAAUGGGCAGCGGCGAAdT	351-369
3979	3980	59570	dT	dT	331-309
33,3	3300	AD-	CCGCCAGCACCAGCGCAACdTd	GUUGCGCUGGUGCUGGCGGd	1840-1858
3981	3982	59415	T	TdT	25.0 2050
	1	AD-	CGCUGAGGGACGGGUGCUUd	AAGCACCCGUCCCUCAGCGdTd	1819-1837
3983	3984	59505	TdT	T	
		AD-	UGGACUUCUCGACUUGAGUd	ACUCAAGUCGAGAAGUCCAdT	69-87
3985	3986	59557	TdT	dT	
		AD-	AAAGAAACCCCUCCGGCCAdTd	UGGCCGGAGGGUUUCUUUd	512-530
3987	3988	59548	Т	TdT	
		AD-	UUGACACCGUACGGUCCUAdT	UAGGACCGUACGGUGUCAAdT	1719-1737
3989	3990	59487	dT	dT	

3991	3992	AD- 59550	CCCUCUUCACCCUGGCUAAdT dT	UUAGCCAGGGUGAAGAGGGdT dT	1293-1311
3331	3992	AD-	CCCCCAGGCCUUUCUGCAGdT	CUGCAGAAAGGCCUGGGGGdT	379-397
3993	3994	59572	dT	dT	
3995	3996	AD- 59554	AUGCCCAAAACUGCCCCAAdTd T	UUGGGGCAGUUUUGGGCAUd TdT	423-441
3997	3998	AD- 59437	CUUGAGUGCCCGCCUCCUUdT dT	AAGGAGGCGGGCACUCAAGdT dT	81-99
		AD-	GGGUACAUCGCCAGCACGAdT	UCGUGCUGGCGAUGUACCCdT	1691-1709
3999	4000	59584	dT	dT	
4001	4002	AD- 59373	GUGUGGGGCAGUUAUGGACd TdT	GUCCAUAACUGCCCCACACdTd T	1123-1141
4001	4002	AD-	ACAUAGUCCUGGAAAUAAAdT	UUUAUUUCCAGGACUAUGUdT	2372-2390
4003	4004	59545	dT	dT	2372 2330
4005	4006	AD- 59547	AUCCCAGCAGAGUCCAGAUdT dT	AUCUGGACUCUGCUGGGAUdT dT	580-598
4003	4000	AD-	CUAGAUUCUUUCCACAGGAdT	UCCUGUGGAAAGAAUCUAGdT	300-318
4007	4008	59470	dT	dT	
		AD-	UUGUUUUCCUCGUGCUUUGd	CAAAGCACGAGGAAAACAAdTd	1259-1277
4009	4010	59417	TdT	Т	
4011	4012	AD- 59535	CCUCCUUCGCCGCCGCCUCdTd	GAGGCGGCGGCGAAGGAGGdT   dT	93-111
4011	4012	AD-	UGAGGCUGCUCCCGGACAAdT	UUGUCCGGGAGCAGCCUCAdT	31-49
4013	4014	59507	dT	dT	
		AD-	CCAACAGACUCCUGAUGGAdT	UCCAUCAGGAGUCUGUUGGdT	562-580
4015	4016	59519	dT	dT	
4017	4018	AD- 59391	UCACAUGGAAGCAAGUGGGdT dT	CCCACUUGCUUCCAUGUGAdT dT	2112-2130
		AD-	CAUUCAAUGGAUGGGGCGGd	CCGCCCAUCCAUUGAAUGdTd	1490-1508
4019	4020	59537	TdT	T	
4021	4022	AD- 59450	AGGAAUGAGUCGCCACCCAdT dT	UGGGUGGCGACUCAUUCCUdT dT	1099-1117
		AD-	UGGACUUAGAGCGGGAGCUd	AGCUCCCGCUCUAAGUCCAdTd	1209-1227
4023	4024	59449	TdT	T	1050 1050
4025	4026	AD- 59418	CUAAAAACACAGAAGUCUGdT dT	CAGACUUCUGUGUUUUUAGd TdT	1950-1968
4023	4020	AD-	CCCUCACCACACACCCCAGdTd	CUGGGGUGUGUGGUGAGGGd	2062-2080
4027	4028	59561	Т	TdT	
4029	4030	AD- 59460	AAUCCUUGCUUCAGGGACUdT dT	AGUCCCUGAAGCAAGGAUUdT dT	171-189
.025	1030	AD-	UUGUGGCAUUUGAAACUGUd	ACAGUUUCAAAUGCCACAAdT	1470-1488
4031	4032	59409	TdT	dT	
		AD-	UCAAUUACCCUACGGUGCCdT	GGCACCGUAGGGUAAUUGAdT	2010-2028
4033	4034	59476	dT	dT	
4035	4036	AD- 59406	CAAGCCAGCCCCUCGGGCAdTd T	UGCCCGAGGGGCUGGCUUGdT dT	460-478
-033	7030	AD-	GAGUCUUCCCUGCCUGGAUdT	AUCCAGGCAGGGAAGACUCdT	259-277
4037	4038	59569	dT	dT	
		AD-	UGGAGAGUGUUGUUCGCCGd	CGGCGAACAACACUCUCCAdTd	339-357
4039	4040	59451	TdT	T	524 520
4041	4042	AD- 59553	ACCCCUUGCCUGCCACAAGdTd T	CUUGUGGCAGGCAAGGGGUdT dT	621-639
	† · · · · ·	AD-	CUGGAUGGAUGAGUGGCUUd	AAGCCACUCAUCCAUCCAGdTd	272-290
4043	4044	59372	TdT	Т	
		AD-	CAAGAUGAUGGAAGUUGGGd	CCCAACUUCCAUCAUCUUGdT	439-457

4047	4048	AD- 59531	UUUCGUUUGGACUUCUCGAd TdT	UCGAGAAGUCCAAACGAAAdT dT	62-80
4049	4050	AD- 59560	UCAUCUUCACCACCUCUCUdT dT	AGAGAGGUGGUGAAGAUGAd TdT	1749-1767
4051	4052	AD- 59489	UGCCCAGUUCUUCCCGCUGdT	CAGCGGGAAGAACUGGGCAdT dT	132-150
4053	4054	AD- 59540	AAAAAUGGACAUCAUUUCUdT dT	AGAAAUGAUGUCCAUUUUUdT	1639-1657
4055	4056	AD- 59378	CUUGAGCUUCAGGAGGAUGd TdT	CAUCCUCCUGAAGCUCAAGdT	719-737
4057	4058	AD- 59403	CCUCUCUGCCACCCAUGCUdTd T	AGCAUGGGUGGCAGAGAGGdT	1761-1779
4059	4060	AD- 59493	AAAGUCAGGAUCCCUAAGAdT dT	UCUUAGGGAUCCUGACUUUdT dT	242-260
4061	4062	AD- 59374	CGACCACGGAGGAAUCCUUdT dT	AAGGAUUCCUCCGUGGUCGdT dT	159-177
4063	4064	AD- 59380	UUCCGUCUGGACACCCCUUdT dT	AAGGGGUGUCCAGACGGAAdT dT	609-627
4065	4066	AD- 59576	CCACCCAUGCUGCUGGCUGdT dT	CAGCCAGCAGCAUGGGUGGdT dT	1769-1787
4067	4068	AD- 59425	UGAGAAAAAGAAUGACCACdT dT	GUGGUCAUUCUUUUUCUCAd TdT	961-979
4069	4070	AD- 59509	UAAGAUGAUGCCAGGCUGUdT dT	ACAGCCUGGCAUCAUCUUAdT dT	1309-1327
4071	4072	AD- 59488	AGUUAUAUUAAAUUUUAAUd TdT	AUUAAAAUUUAAUAUAACUdT dT	2342-2360
4073	4074	AD- 59486	UCUUCCCGCUGUGGGGACAdT dT	UGUCCCCACAGCGGGAAGAdT dT	140-158
4075	4076	AD- 59465	UGCCACAAGCCAGGGCACUdT dT	AGUGCCCUGGCUUGUGGCAdT dT	631-649
4077	4078	AD- 59484	AGCGCAGUUAUGCCCAGUUdT dT	AACUGGGCAUAACUGCGCUdT dT	122-140
4079	4080	AD- 59368	GGACCAGGAGAAAGUCAGGdT dT	CCUGACUUUCUCCUGGUCCdT dT	232-250
4081	4082	AD- 59464	UGUCCACUGCCCCAGCCACdTd T	GUGGCUGGGGCAGUGGACAdT dT	1903-1921
4083	4084	AD- 59386	AUCGCGGCCUGAGGCUGCUdT dT	AGCAGCCUCAGGCCGCGAUdT dT	22-40
4085	4086	AD- 59439	GGGGAUGUGGGGACCAGGAd TdT	UCCUGGUCCCCACAUCCCCdTd T	222-240
4087	4088	AD- 59440	CUGGAAAUAAAUUCUUGCUdT dT	AGCAAGAAUUUAUUUCCAGdT dT	2380-2398
4089	4090	AD- 59542	UUGAAACUGUCCAUUCAAUdT dT	AUUGAAUGGACAGUUUCAAdT dT	1479-1497
4091	4092	AD- 59559	GUGGGGACACGACCACGGAdT dT	UCCGUGGUCGUGUCCCCACdT dT	150-168
4093	4094	AD- 59586	CGCAGUGGGGCUUUAUGGGd TdT	CCCAUAAAGCCCCACUGCGdTd T	1579-1597
4095	4096	AD- 59408	UUGUCUUUAUAUGUGAAUUd TdT	AAUUCACAUAUAAAGACAAdT dT	2322-2340
4097	4098	AD- 59568	UCACCCUGGCUAAGAUGAUdT dT	AUCAUCUUAGCCAGGGUGAdT dT	1299-1317
4099	4100	AD- 59398	GUAUCUGCUCAGGCCUGAGdT dT	CUCAGGCCUGAGCAGAUACdT dT	2243-2261
4101	4102	AD- 59508	AUGAGUGGCUUCUUCUCCAdT dT	UGGAGAAGAAGCCACUCAUdT dT	280-298

4102	4104	AD-	GAAGUUGGGGCCAAGCCAGdT	CUGGCUUGGCCCCAACUUCdT	449-467
4103	4104	59523	dT	dT	404 400
44.05	4406	AD-	UCAGGGACUCGGGACCCUGdT	CAGGGUCCCGAGUCCCUGAdT	181-199
4105	4106	59410	dT	dT	2042 2064
44.07	1100	AD-	UCCUACGGAUUGCCCCCACdT	GUGGGGCAAUCCGUAGGAdT	2043-2061
4107	4108	59541	dT	dT	4000 4054
4400	1	AD-	UUACUCUGAUUCUGGGAACdT	GUUCCCAGAAUCAGAGUAAdT	1333-1351
4109	4110	59524	dT	dT	
	1443	AD-	AUCCCUAAGAGUCUUCCCUdT	AGGGAAGACUCUUAGGGAUdT	251-269
4111	4112	59501	dT	dT	1200 1107
4443	4444	AD-	UGCCAAAGUACAUCUUCCGdT	CGGAAGAUGUACUUUGGCAdT	1389-1407
4113	4114	59383	dT	dT	310 330
		AD-	UCCUCGGGUUUAGGGGAUGd	CAUCCCCUAAACCCGAGGAdTd	210-228
4115	4116	59577	TdT	T	
4447	1110	AD-	UGCUGAAACCUCAGCAGGCdT	GCCUGCUGAGGUUUCAGCAdT	769-787
4117	4118	59447	dT	dT	4444 4430
4440	4430	AD-	CCACCCACGGGUGUGUGGGdT	CCCACACACCCGUGGGUGGdT	1111-1129
4119	4120	59555	dT	dT	4070 4007
4434	4433	AD-	UGGUGCAGUAAUGACUACCdT	GGUAGUCAUUACUGCACCAdT	1079-1097
4121	4122	59405	dT	dT	202 240
44.22	1,,,,,	AD-	UUCUCCACCUAGAUUCUUUdT	AAAGAAUCUAGGUGGAGAAdT	292-310
4123	4124	59371	dT	dT	
4435	4426	AD-	UAAGGCGCCGGCGAUCGCGdT	CGCGAUCGCCGGCGCCUUAdT	9-27
4125	4126	59443	dT	dT	4400 4307
44.27	4430	AD-	UGGAACUAGUAAAUUCCAUdT	AUGGAAUUUACUAGUUCCAdT	1189-1207
4127	4128	59401	dT	dT	103 310
4430	4430	AD-	GGACCCUGCUGGACCCCUUdT	AAGGGGUCCAGCAGGGUCCdT dT	192-210
4129	4130	59494 AD-	dt UCAAUUAUUUCACUUAACCdT	GGUUAAGUGAAAUAAUUGAd	2269-2287
4131	4132	59504	dT	TdT	2209-2267
4151	4132	AD-	CCCGGACAAGGGCAACGAGdT	CUCGUUGCCCUUGUCCGGGdT	41-59
4133	4134	59369	dT	dT	41-59
4133	4134	AD-	UUUUAAAACUGUGAACCGGdT	CCGGUUCACAGUUUUAAAAdT	991-1009
4135	4136	59571	dT	dT	991-1009
4155	4130	AD-	GUGCUUCGCCGCCAGCACCdT	GGUGCUGGCGGCGAAGCACdT	1832-1850
4137	4138	59527	dT	dT	1032-1030
4137	4136	AD-	UGGACCCCUUCCUCGGGUUdT	AACCCGAGGAAGGGGUCCAdT	201-219
4139	4140	59466	dT	dT	201-219
4133	4140	AD-	CUGUAUAUUAAGGCGCCGGdT	CCGGCGCCUUAAUAUACAGdT	1-19
4141	4142	59526	dT	dT	1-19
4141	4142	AD-	UUGCCCCCACCCUCACCAdTd	UGGUGAGGGGUGGGGCAAd	2052-2070
4142	1111	59543	T	TdT	2032-2070
4143	4144				1500 1510
41.45	1116	AD-	AUGGGGCGGUGUGCCCACUdT	AGUGGGCACACCGCCCCAUdTd	1500-1518
4145	4146	59564	Tb	T	2261 2270
41.47	4140	AD-	CUAUAGUAAAAACAUAGUCdT	GACUAUGUUUUUACUAUAGd	2361-2379
4147	4148	59583	dT	TdT	

In vitro активность siRNA в подавлении mRNA ALAS1 исследовали в скрининге разовой дозы в клетках Hep3B, которые трансфицировали с использованием Lipofectamine2000 в качестве средства трансфекции. Эксперименты по разовой дозе выполняли при концентрации дуплекса 10 нМ и анализировали при помощи анализа с разветвленной ДНК (bDNA). Результаты показаны в табл. 19 и выражены в виде процента оставшейся mRNA.

Таблица 19. Подавление mRNA ALAS1, определенное при помощи анализа с bDNA

Дуплекс	% оставшейся	SD
Hybrene	mRNA	
AD-59453	11,2	1,5
AD-59395	12,7	1,1
AD-59477	14,5	2,0
AD-59492	14,8	2,1
AD-59361	15,1	4,9
AD-59462	15,4	2,6
AD-59433	15,8	2,7
AD-59424	16,0	1,7
AD-59414	16,1	1,3
AD-59539	16,2	2,6
AD-59400	16,2	1,8
AD-59551	16,3	2,3
AD-59482	16,6	2,1
AD-59448	16,6	3,7
AD-59392	16,9	3,5
AD-59469	16,9	2,2
AD-59431	17,0	2,0
AD-59423	17,1	3,8
AD-59517	17,2	1,5
AD-59578	17,3	3,1
AD-59495	17,7	3,7
AD-59432	17,7	2,8
AD-59382	17,9	3,2
AD-59472	18,6	3,5
AD-59459	18,7	3,8
AD-59413	18,8	2,4
AD-59478	18,9	3,0
AD-59376	18,9	3,2
AD-59556	18,9	2,4
AD-59399	19,0	4,1
AD-59474	19,4	1,6
AD-53542	19,4	1,7
AD-59480	19,6	1,6
AD-59549	19,7	2,1
AD-59515	19,8	4,4
AD-59427	19,9	3,2
AD-59390	19,9	3,4
AD-59511	19,9	2,2

AD-59532	20,0	2,4
AD-59562	20,2	2,6
AD-59513	20,3	3,9
AD-59362	20,6	2,5
AD-53541	20,6	2,2
AD-59490	20,7	2,3
AD-59422	20,8	4,5
AD-59467	21,2	2,3
AD-59579	21,2	3,3
AD-59426	21,7	2,3
AD-59363	21,7	2,7
AD-59436	21,7	2,7
AD-53536	21,9	1,5
AD-59491	21,9	2,6
AD-59500	22,2	2,8
AD-59394	22,3	10,1
AD-59441	22,3	2,6
AD-59365	22,4	4,2
AD-59411	22,5	2,9
AD-59544	22,5	2,1
AD-59428	22,7	4,7
AD-59471	22,9	5,0
AD-59518	22,9	2,3
AD-53547	22,9	1,5
AD-59573	23,0	4,2
AD-59473	23,2	1,8
AD-59412	23,4	2,5
AD-59522	23,4	3,3
AD-59502	23,6	2,7
AD-59499	23,6	1,6
AD-59520	23,8	3,8
AD-59581	23,9	6,0
AD-59461	24,3	4,2
AD-59370	24,3	5,6
AD-53540	24,4	2,1
AD-59574	24,5	2,0
AD-59375	24,6	2,3
AD-59387	24,8	7,2
AD-59397	24,9	9,6
AD-59396	25,0	10,2
AD-59393	25,3	11,6
AD-59483	25,4	3,8
	•	•

AD-59430	25,5	1,8
AD-59463	25,6	4,8
AD-53534	25,9	3,1
AD-59514	26,2	5,7
AD-59575	26,2	3,2
AD-59364	26,2	4,5
AD-59402	26,3	3,1
AD-59479	26,3	2,5
AD-59481	26,4	2,2
AD-59530	26,4	4,4
AD-59582	26,6	3,9
AD-59506	27,0	4,1
AD-59567	27,3	1,1
AD-59485	27,7	4,7
AD-59525	28,3	3,1
AD-59566	28,5	0,6
AD-59580	28,7	7,1
AD-59512	29,5	2,5
AD-59475	29,6	4,2
AD-59438	29,6	3,3
AD-59442	29,9	2,8
AD-59516	30,4	3,8
AD-59429	30,8	4,3
AD-59510	31,3	1,9
AD-59457	31,4	1,2
AD-59434	31,6	3,5
AD-59454	32,0	1,9
AD-59468	32,2	3,2
AD-59565	32,4	1,5
AD-59416	32,7	1,7
AD-59420	33,2	3,1
AD-59552	33,2	2,2
AD-59558	33,8	3,8
AD-59404	34,0	5,4
AD-59455	34,8	1,3
AD-59496	34,9	5,2
AD-59446	35,5	1,7
AD-59435	35,9	1,2
AD-59419	36,0	1,4
AD-59533	36,7	3,7
AD-59366	36,7	6,0
AD-59521	36,9	4,3

AD-59563	36,9	4,1
AD-59534	36,9	3,3
AD-59407	37,1	4,7
AD-59445	37,2	3,2
AD-59546	37,9	4,9
AD-59456	38,3	4,0
AD-59503	38,8	5,0
AD-59536	39,8	4,2
AD-59385	39,9	13,7
AD-59367	40,0	3,6
AD-59458	40,0	3,4
AD-59381	40,3	9,9
AD-59538	40,8	4,9
AD-59421	40,9	6,4
AD-59388	41,0	9,1
AD-59444	41,1	2,7
AD-59528	41,9	3,3
AD-59498	42,2	3,3
AD-59497	42,4	4,9
AD-59384	42,7	17,6
AD-59452	42,7	3,1
AD-59379	43,6	2,6
AD-59529	43,8	4,8
AD-59389	44,1	6,4
AD-59585	44,3	3,2
AD-59570	45,1	4,0
AD-59415	46,6	2,3
AD-59505	47,5	6,2
AD-59557	48,1	4,4
AD-59548	49,9	4,0
AD-59487	50,7	3,2
AD-59550	50,8	5,8
AD-59572	51,1	4,0
AD-59554	51,3	6,0
AD-59437	52,2	4,8
AD-59584	54,9	2,7
AD-59373	55,3	20,1
AD-59545	55,4	3,4
AD-59547	55,9	4,7
AD-59470	56,0	2,7
AD-59417	56,4	7,7
AD-59535		
	57,6	5,1

AD-59507	58,8	4,7
AD-59519	59,1	5,6
AD-59391	60,1	12,5
AD-59537	60,6	9,1
AD-59450		
	60,7	7,2
AD-59449	61,6	6,8
AD-59418	61,8	8,4
AD-59561	62,2	7,2
AD-59460	62,8	4,7
AD-59409	64,4	9,0
AD-59476	65,2	5,6
AD-59406	65,6	3,5
AD-59569	66,7	7,6
AD-59451	66,9	2,9
AD-59553	67,2	8,8
AD-59372		25,6
	67,3	
AD-59377	68,7	5,1
AD-59531	68,7	9,0
AD-59560	68,7	12,7
AD-59489	69,6	8,9
AD-59540	70,1	10,1
AD-59378	70,6	14,1
AD-59403	71,4	3,3
AD-59493	72,3	3.5
AD-59374	75,9	5,1
AD-59380	76,4	11,1
AD-59576	77,5	16,2
AD-59425	77,9	10,6
AD-59509	78,0	3,2
AD-59488	78,6	7,1
AD-59486	79,4	5,0
AD-59465	79,5	5,1
AD-59484	79,8	3,2
AD-59368	80,0	11,9
AD-59464	80,2	9,3
AD-59386	80,6	33,2
AD-59439	80,9	4,0
AD-59440		
	82,2	1,9
AD-59542	83,3	10,6
AD-59559	83,7	9,1
AD-59586	83,8	11,5
AD-59408	86,3	2,8
AD FOECO	000	1.2
AD-59568	86,8	4,2
AD-59398	87,4	24,9
AD-59508	87,5	2,5
AD-59523	87,6	11,8
AD-59410	88,8	8,3
AD-59541	88,9	10,8
AD-59524	89,5	12,1
AD-59501	89,9	5,1
AD-59383	90,8	
	+ '	27,4
AD-59577	91,1	2,3
AD-59447	91,3	12,9
AD-59555	91,7	3,4
AD-59555 AD-59405	91,7 92,5	3,4 5,7
AD-59405 AD-59371	92,5 93,5	5,7 31,7
AD-59405 AD-59371 AD-59443	92,5 93,5 93,8	5,7 31,7 9,0
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401	92,5 93,5 93,8 94,5	5,7 31,7 9,0 7,1
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 96,8	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 96,8 97,4	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369 AD-59571 AD-59527	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 96,8	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369 AD-59571	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 96,8 97,4	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8 7,0
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369 AD-59571 AD-59527	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 96,8 97,4 98,6	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8 7,0 7,8
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369 AD-59571 AD-59527 AD-59466 AD-59526	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 96,8 97,4 98,6 99,7 102,9	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8 7,0 7,8 14,0 4,6
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369 AD-59571 AD-59527 AD-59466 AD-59526 AD-59543	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 97,4 98,6 99,7 102,9 103,7	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8 7,0 7,8 14,0 4,6 3,0
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59569 AD-59571 AD-59527 AD-59466 AD-59526 AD-59543 AD-59564	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 97,4 98,6 99,7 102,9 103,7	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8 7,0 7,8 14,0 4,6 3,0 12,1
AD-59405 AD-59371 AD-59443 AD-59401 AD-59494 AD-59504 AD-59369 AD-59571 AD-59527 AD-59466 AD-59526 AD-59543	92,5 93,5 93,8 94,5 95,1 96,8 97,4 98,6 99,7 102,9 103,7	5,7 31,7 9,0 7,1 9,1 11,7 4,8 7,0 7,8 14,0 4,6 3,0

Двести тридцать два дуплекса, которые были исследованы, подавляли mRNA ALAS1 в различной степени в этом анализе разовой дозы. Согласно этому анализу, по меньшей мере четыре из дуплексов (AD-59453, AD-59395, AD-59477 и AD-59492) подавляли mRNA ALAS1 на 85% или более, 39 из дуплексов подавляли mRNA ALAS1 на 80% или более, 101 из дуплексов подавляли mRNA ALAS1 на 70% или более, и 152 из дуплексов подавляли mRNA ALAS1 на 50% или более. В противоположность, некоторые дуплексы не характеризовались заметным подавлением в данном анализе.

Пример 13. Дозочувствительное ингибирование предшественников порфиринов ALA и PBG при помощи siRNA ALAS1

Дозочувствительные эффекты siRNA ALAS1 исследовали в мышиной модели AIP (см. пример 5). В этой модели показана ~30% остаточная активность PBGD, ~2-кратное повышение исходных уровней ALA и PBG, ~30-100-кратное повышение уровней ALA и PBG после индукции инъекциями фенобарбитала раз в день в течение 3-4 дней. У более старых животных наблюдалась дегенерация аксонов и нарушенная двигательная функция.

siRNA ALAS1, используемая в этом примере, представляла собой дуплекс AD-53558 в составе AF11. На 1 день мышам вводили 1, 0,5, 0,1 или 0,05 мг/кг siRNA ALAS1 или контроль LUC AD-1955 путем внутривенной инъекции. Вводили три инъекции фенобарбитала (1 инъекция в сутки на 2, 3 и 4 дни) для индукции ALAS1 в печени и предшественников порфирина, ALA и PBG. Образцы плазмы и ночной мочи собирали на 5 день, а уровни метаболитов измеряли при помощи LC-MS. Исходные уровни ALA и PBG измеряли перед первой обработкой на 1 день. Результаты показаны на фиг. 16. siRNA ALAS1 ингибировала уровни ALA и PBG дозозависимым образом. Ингибиторный эффект на уровни ALA в плазме наблюдали в дозах siRNA ALAS1 до 0,05 мг/кг, а ингибиторный эффект на уровни PBG в плазме отмечали в дозах siRNA до 0,1 мг/кг.

Пример 14. Стойкое ингибирование предшественников порфиринов ALA и PBG при помощи siRNA ALAS1

Стойкость эффектов siRNA ALAS1 исследовали в мышиной модели AIP (см. пример 5). siRNA ALAS1, используемая в этом примере, представляла собой дуплекс AD-53558 в составе AF11. Схема эксперимента и результаты этого эксперимента показаны на фиг. 17. На 1 день мышам вводили 1 мг/кг siRNA ALAS1 или контроль LUC AD-1955 путем внутривенной инъекции. Три инъекции фенобарбитала вводили на 0 неделе (1 инъекция в день на 2, 3 и 4 дни), 2 неделе (1 инъекция в день на 15, 16 и 17 дни) и 4 неделе (1 инъекция в день на 29, 30 и 31 дни) для индукции ALAS1 в печени и предшественников порфиринов ALA и PBG. Образцы плазмы и ночной мочи собирали на 5, 18 и 32 дни, а уровни метаболитов измеряли при помощи LC-MS. Исходные уровни ALA и PBG измеряли перед первой обработкой на 1 день.

Как показано на фиг. 17, siRNA ALAS1 оказывала стойкий эффект в снижении уровней ALA и PBG в плазме. Введение siRNA ALAS1 подавляло уровни ALA и PBG в плазме по меньшей мере в течение 2 недель. Из этих результатов видно, что siRNA ALAS1 является эффективным лекарственным препаратом для снижения повышенных уровней ALA и PBG и, таким образом, может использоваться в профилактике, например, для снижения хронически повышенных уровней ALA и PBG и для предупреждения рецидивирующих приступов порфирии.

Пример 15. siRNA ALAS1 обеспечивает более быстрое наступление действия по сравнению с лечением гемином

Эффекты обработки siRNA ALAS1 сравнивали с эффектами обработки гемином в мышиной модели AIP (см. пример 5). siRNA ALAS1, используемая в этом примере, представляла собой дуплекс AD-53558 в составе AF11. Схема эксперимента и результаты этого эксперимента показаны на фиг. 18. Фенобарбитал (PB) и диэтилдитиокарбамат (DDC) вводили на 1, 2 и 3 дни. DDC представляет собой другой индуктор p450, который, как и фенобарбитал, повышает потребность в геме и способствует продлению индукции метаболитов ALA/PBG.

 $\Gamma$ емин в дозе 4 мг/кг, siRNA ALAS1 в дозе 2 мг/кг или контрольный лекарственный препарат вводили внутривенно через 8 ч после последней дозы PB и DDC.

Как показано на фиг. 18, наступление действия лекарственного препарата было более быстрым при лечении siRNA ALAS1 по сравнению с лечением гемином. Быстрое снижение уровней ALA и PBG при лечении siRNA указывает на то, что siRNA является эффективным лекарственным препаратом для лечения острых приступов, поскольку ожидается, что быстрое улучшение клинических симптомов будет сопровождаться снижением уровней ALA и PBG.

Пример 16. Эффекты AD-58632 на основе конъюгата GalNAc с siRNA ALAS1

AD-58632 представляет собой дуплекс из 21/23 нуклеотидов, раскрытых в примере 11. AD-58632 нацелен на транскрипт человека NM\_ 000688.4, а также является кросс-реактивным по отношению к mRNA-транскриптам мышей, крыс и макак-крабоедов. AD-58632 был единственным кросс-реактивным дуплексом из 21/23 нуклеотидов, идентифицированным в результате скрининга приблизительно 45 соединений. Дополнительные эксперименты с этим дуплексом описаны в данном примере.

### Дозозависимые эффекты AD-58632 в подавлении mRNA ALAS1

У крыс исследовали дозозависимый эффект AD-58632 в подавлении mRNA ALAS1 относительно mRNA GAPDH. Исследовали дозы 30, 10 и 3 мг/кг. Уровни mRNA ALAS1 измеряли в печени через 72 часа после последней дозы. AD-58632, по сравнению с контролем PBS, подавлял mRNA ALAS1 дозозависимым образом (см. фиг. 19). AD-58632 характеризовался разовой дозой ED50 приблизительно 10 мг/кг.

#### Эффекты AD-58632 в крысиной модели AIP

Дозозависимый эффект конъюгата AD-58632 на основе GalNAc с siRNA ALAS1 дополнительно исследовали в крысиной модели AIP. В этой модели siRNA в LNP использовали для нокдауна уровня PBGD исключительно в печени до индукции потребности в геме фенобарбиталом. Крысиная модель AIP характеризуется временным нокдауном siRNA PBGD в печени, характеризуется ~15% остаточной активностью mRNA PBGD и характеризуется приблизительно 10-50-кратным повышением уровней ALA и PBG при индукции суточной инъекцией фенобарбитала в течение трех дней.

Схема эксперимента показана на фиг. 20. Исследовали четыре группы крыс. Одну группу обрабатывали только фенобарбиталом (PB) в указанные временные точки. Вторую группу обрабатывали фенобарбиталом и siRNA порфобилиногендезаминазы (PBGD). Третья группа получала фенобарбитал, siRNA PBGD и дозу в 30 мг/кг siRNA ALAS1. Четвертая группа получала фенобарбитал, siRNA PBGD и дозу в 10 мг/кг siRNA ALAS1. Как показано на фиг. 20, siRNA PBGD вводили внутривенно на 1 день. siRNA ALAS1 с GalNAс вводили на 4 день. Инъекции фенобарбитала вводили на 4, 5, 6 и 7 дни. Мочу собирали в течение 24-часового периода, начиная на 7 день и заканчивая на 8 день. Уровни mRNA PBGD, mRNA GAPDH и mRNA ALAS-1 оценивали на 8 день при помощи анализа с bDNA. Уровни PBG и ALA в моче определяли при помощи LC-MS.

Результаты по mRNA показаны на фиг. 21. siRNA PBGD снижала уровень mRNA PBGD, но не снижала уровень mRNA ALAS1. siRNA ALAS1 снижала уровни mRNA ALAS1 дозозависимым образом (см. фиг. 21). Результаты по уровням ALA и PBG показаны на фиг. 22. siRNA ALAS1 снижала уровни ALA и PBG дозозависимым образом (см. фиг. 22).

Пример 17. Введение дробных доз AD-58632

Эффективность конъюгата GalNAc с siRNA ALAS1 AD-58632 исследовали в двух отдельных парадигмах с введением дробных доз. Для каждого из этих исследований использовали самок крыс линии Sprague Dawley. Крыс содержали в SCLR (комната со световым циклом, в которой в течение 12 ч свет включен и в течение 12 ч свет выключен) и выводили из эксперимента через 72 ч после последней инъекции. Уровни mRNA ALAS1 и GAPDH в печени измеряли при помощи анализа с разветвленной ДНК (bDNA).

#### Парадигма пяти суточных доз против разовой болюсной дозы

В первой парадигме группам крыс вводили либо пять доз siRNA (по одной дозе каждый день), либо разовую болюсную дозу, которая содержала такую же общую концентрацию, как и сумма из пяти отдельных доз. В частности, крыс закрепляли за одним из следующих условий обработки: (1) подкожная инъекция по 6 мг/кг siRNA раз в день в течение пяти дней, (2) подкожная инъекция по 2 мг/кг siRNA раз в день в течение пяти дней, (3) подкожная инъекция по 1 мг/кг siRNA раз в день в течение пяти дней, (4) подкожная инъекция разовой болюсной дозы из 30 мг/кг siRNA, (5) подкожная инъекция разовой болюсной дозы из 5 мг/кг siRNA или (7) контрольный лекарственный препарат, представляющий собой PBS.

Результаты показаны на фиг. 23. В этой парадигме разовая болюсная доза siRNA оказывала большее подавление mRNA ALAS1, чем повторное введение доз той же концентрации siRNA в течение пяти дней. Это было справедливо для всех изученных доз.

### Введение дозы раз в неделю в течение четырех недель

При второй парадигме крысам вводили подкожные инъекции siRNA в одной из трех доз (10 мг/кг, 5 мг/кг или 2,5 мг/кг) раз в неделю в течение четырех недель. Контрольная группа получала инъекции PBS.

Результаты показаны на фиг. 24. По сравнению с введением разовой дозы, введение четырех доз раз в неделю по 10 мг/кг повышало достигаемый максимальный нокдаун (ED50 составляет 10 мг/кг в разовой дозе). В отличие от этого введение нескольких доз по 5 и 2,5 мг/кг в неделю при этой парадигме не повышало сайленсинг.

Пример 18. Идентификация и исследование siRNA ALAS1 с более КОРОТКИМИ смысловой и антисмысловой нитями

Дополнительные эксперименты проводили для исследования эффектов укорочения дуплексов siR-NA до 19-19 нуклеотидов. Были выявлены пять дополнительных новых кросс-реактивных дуплексов из 19-19 нуклеотидов, которые связываются с mRNA-транскриптами ALAS1 человека (h) (NM\_000688.4), макака-резус (rh) (XM\_001090440.2), мыши (m) (NM\_020559.2) и крысы (r) (NM\_024484.2). Ни один из этих дуплексов не характеризовался такими же хорошими результатами, как AD-58632 из 21/23 нуклеотидов (см. фиг. 25).

Исследовали эффекты модификации длины и выступающих концов в отношении двух лучших дуплексов из 19-19 нуклеотидов (AD-59115 и AD-59125) (фиг. 26 и 27). Модифицированные последователь-

ности показаны в табл. 21.

Таблица 21. Последовательности для оценки длины/выступающего конца лучших двух дуплексов из 19-19 нуклеотидов

		Целевые					
SEQ ID NO: (смы слов ая)	SEQ ID NO: (анти- смысл овая)	сайты анти- смысловой последова- тельности NM_ 000688.4	Кросс- реактив- ность	Выступаю- щий конец	Название дуплекса	Смысловая последова- тельность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность (5'-3')
4172	4173	877-895	h/rh/m/r	19/19	AD-59115	AfsasGfaGfuGfu CfUfCfaUfcUfuC fuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcsusu
4174	4175	875-895	h/rh/m/r	19/21	AD-60090	AfsasGfaGfuGfu CfUfCfaUfcUfuC fuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfususc
4176	4177	877-895	NC OH*	19/21	AD-60091	AfsasGfaGfuGfu CfUfCfaUfcUfuC fuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfusasa
4178	4179	873-895	h/rh/m/r	21/23	AD-58632	GfsasAfaGfaGfu GfUfCfuCfaUfcU fuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg
4180	4181	875-895	NC OH*	21/23	AD-60092	GfsasAfaGfaGfu GfUfCfuCfaUfcU fuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsasa
4182	4183	875-893	h/rh/m/r	19/19	AD-59129	GfsasAfaGfaGfu GfUfCfuCfaUfcU fuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfususc
4184	4185	873-893	h/rh/m/r	19/21	AD-60093	GfsasAfaGfaGfu GfUfCfuCfaUfcU fuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcsusg
4186	4187	875-893	NC OH*	19/21	AD-60094	GfsasAfaGfaGfu GfUfCfuCfaUfcU fuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcsasa
4188	4189	871-893	h/rh	21/23	AD-60095	CfsasGfaAfaGfa GfuGfUfCfuCfaU fcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcUfgsgsu
4190	4191	871-893	m/r	21/23	AD-60096	CfsasGfaAfaGfa GfuGfUfCfuCfaU fcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcUfgsgsc

<sup>\*</sup>Некомплементарный выступающий конец

Выступающие концы повышали эффективность. Они также представляли дополнительную производную последовательность (AD-60489, который был основан на AD-60095) для дополнительных исследований связи структура-активность (SAR) (1 ошибочно спаренное основание в положении 23 грызуна).

Пример 19. Эффекты AD-60489 и AD-58632 на основе конъюгатов GalNAc с siRNA ALAS1

Исследовали эффекты дополнительного дуплекса AD-60489 на основе конъюгата GalNAc с siRNA ALAS1 и сравнивали их с эффектами AD-58632. Последовательности таких дуплексов показаны в табл. 22A. AD-60489 содержит одно ошибочно спаренное основание по отношению к mRNA ALAS1 грызуна на 3'-конце антисмысловой нити. Таким образом, в случае если AD-58632 полностью комплементарен последовательностям человека, макака-крабоеда, мыши и крысы, то AD-60489 полностью комплементарен только последовательностям человека и макака-крабоеда.

Таблица 22A. Последовательности дуплексов AD-58632 и AD-60489 с siRNA ALAS1

SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	Целевые сайты	Название	Смысловая	Антисмысловая
(смысловая)	(анти- смысловая)	антисмысловой последовательности NM_ 000688.4	дуплекса	последовательность (5'-3')	последовательность (5'-3')
4149	4150	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUf CfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg
4151	4152	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUf GfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcUfgsgsu

Подавление mRNA ALAS1 показано на фиг. 28. По сравнению с AD-58632, AD-60489 обеспечивал более эффективное подавление при 3 и 10 мг/кг и характеризовался приблизительно двукратным улучшением ED50. Разовая доза ED50 AD-60489 составляла приблизительно 5 мг/кг.

Пример 20. Эффекты AD-60489 и AD-58632 на основе конъюгатов GalNAc с siRNA ALAS1 в исследованиях на отличных от человека приматах

Эффективность AD-58632 и AD-60489 в подавлении mRNA в печени исследовали у отличных от человека приматов. Схема эксперимента показана на фиг. 29. Дозы siRNA (5, 2,5 или 1,25 мг/кг) или контроля PBS в объеме 2 мл/кг вводили подкожно каждый день в течение 5 дней, затем каждые 2 дня в течение 3 недель. Сайленсинг mRNA

ALAS1 оценивали в ткани печени, полученной в результате биопсии печени на 15 день. Биопсию брали после забора сыворотки и до введения дозы 10 (см. фиг. 29). Образцы сыворотки для способа оп-

ределения циркулирующей внеклеточной РНК (cERD) (см. пример 21) собирали на -10, -3, 7, 15, 23, 31 и 43 дни. Сыворотки собирали для биохимического анализа крови на -3, 6, 30 и 43 дни. Биохимический анализ включал оценку уровней аланинтрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP).

AD-58632 и AD-60489 подавляли уровни mRNA ALAS1 в печени дозозависимым образом (см. фиг. 30). AD-60489 характеризовался более высокой эффективностью, чем AD-58632. Например, в наименьшей изученной дозе (1,25 мг/кг) AD-60489 подавлял относительный транскрипт ALAS1 на приблизительно 42% от контрольного уровня, в то время как AD-58632 характеризовался незначительным подавлением в этой дозе. При 2,5 мг/кг AD-60489 подавлял относительный транскрипт ALAS1 на приблизительно 26% от контрольного уровня, в то время как AD-58632 подавлял относительный транскрипт ALAS1 на приблизительно 64% от контрольного уровня. При 5 мг/кг AD-60489 подавлял относительный транскрипт ALAS1 на приблизительно 21% от контрольного уровня, а AD-58632 подавлял относительный транскрипт ALAS1 на приблизительно 55% от контрольного уровня.

Результаты клинической биохимии указывали, что длительный нокдаун ALAS1 при помощи siRNA ALAS1 был безопасным и хорошо переносился. Повышений уровней ALT, AST или ALP отмечено не было.

Пример 21. Эффекты AD-60489 и AD-58632 на основе конъюгатов GalNAc с siRNA ALAS1 в исследованиях на отличных от человека приматах, которые оценивали при помощи анализа сERD

Эффекты AD-60489 и AD-58632 на основе конъюгатов GalNAc с siRNA ALAS1 оценивали у отличных от человека приматов при помощи способа определения циркулирующей внеклеточной PHK (cERD). Этот способ описан, например, в Sehgal, A. et al. Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA (постер, представленный 9 февраля 2012 г. на симпозиуме Keystone Gene Silencing by small RNAs (Ванкувер, 7-12 февраля, 2012 г.) и Sehgal, A. et al. Tissue-specific gene silencing monitored in сirculating RNA, RNA, 20: 1-7, опубликованном во всемирной сети Интернет 19 декабря 2013 г. Как показано на фиг. 29, образцы сыворотки для способа определения циркулирующей внеклеточной РНК (cERD) собирали на -10, -3, 7, 15, 23, 31 и 43 дни.

Для анализа cERD образцы сыворотки размораживали на льду. 375-400 мкл 8 M LiCl добавляли к 3-3,5 мл сыворотки в ультрацентрифужные (UC) пробирки и инкубировали при температуре 4°C в течение по меньшей мере 1 ч. PBS добавляли сверху каждой UC пробирки, оставляя приблизительно 1 см сухого пространства сверху, чтобы предупредить сжатие стенок пробирок во время вращения. Пробирки сушили с удалением любого конденсата вследствие инкубации на льду. Образцы загружали в MC 55 Rotor под крышку и образцы центрифугировали при 150000-200000 g в течение 100-120 мин. Супернатант удаляли из осадка. 1 мл тризола добавляли к осадку в UC пробирке, пробирку перемешивали на вортексе и содержимое переносили в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку. В каждую пробирку добавляли 200 мкл хлороформа и пробирку несколько раз опрокидывали верх дном для перемешивания. За один раз получали один образец. Образцы центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10-20 мин при 4°C. Верхнюю водную фазу переносили в свежую 1,5 мл пробирку (объем ~500 мкл). Равные объемы 100% изопропанола, 1 мкл линейного акриламида (4°) и  $1/10^{yw}$  объема 3M NaoAc с pH 5,5 или менее добавляли к каждому образцу (как правило, 500 мкл изопропанола и 50 мкл NaoAc). Образец центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10 мин при 4°C. Супернатанты откладывали. Осадок промывали два раза охлажденным 70% EtOH (500 мкл при каждой промывке) и центрифугировали при 13000 об./мин в течение ~5 мин при 4°C после каждой промывки. Осадку позволяли высохнуть на воздухе в течение ~5 мин и затем ресуспендировали в 20 мкл NF H<sub>2</sub>O. 10 мкл использовали в реакции с cDNA. Ресуспендированную РНК хранили при -80°C.

#### Результаты

Нокдаун mRNA в сыворотке, как было оценено при помощи анализа cERD, коррелировал с результатами, полученными в результате биопсии печени. См. фиг. 31. Это является неожиданным результатом, поскольку ALAS1 не является сывороточным белком. Анализ cERD, представленный в данном документе, способствует отслеживанию циркулирующей mRNA ALAS1. Это имеет преимущество, например, в том, что уровни mRNA ALAS1 можно измерять со временем без периодических биопсий печени, что было бы технически сложным и дорогостоящим.

Кинетику нокдауна mRNA определяли с помощью результатов анализа cERD. См. фиг. 32. AD-60489 обеспечивал более чем 50% нокдаун, даже в дозе лишь 1,25 мг/кг.

Пример 22. Исследования безопасности siRNA ALAS1

Дополнительные исследования безопасности указывают на то, что длительный нокдаун ALAS1 является безопасным и хорошо переносится.

#### Исследования на отличных от человека приматах

Как описано выше (см. пример 20), в исследованиях на отличных от человека приматах повышений уровней ALT, AST или ALP после введения AD-60489 и AD-58632 не наблюдали.

#### Исследования на крысах

На крысах в течение четырех недель проводили исследование с применением AD-58632. siRNA

вводили каждый день в течение 5 дней по 10 мг/кг в первую неделю, затем через день по 10 мг/кг в течение 2-4 недель исследования. Общее воздействие составило 140 мг. Побочных клинических признаков или изменений веса тела не наблюдали. Изменений, связанных с исследуемым препаратом, в параметрах крови или свертываемости крови не наблюдали. Кроме того, не наблюдали побочной гистопатологической картины. Наблюдали минимальную вакуолизацию в селезенке и минимальный субкапсулярный фиброз в почке.

#### Исследования на мышах

У мышей mRNA P450 оценивали после нокдауна ALAS1. Наблюдали незначительные дозозависимые повышения Cyp2b10 через 48 ч после введения состава LNP с ALAS1. Через 168 ч происходил возврат к норме.

Пример 23. Идентификация дополнительных эффективных siRNA ALAS1 с помощью исследований связи структура-активность

Исследования связи структура-активность (SAR), в том числе исследования, описанные в других примерах в данном документе, проводили для идентификации дополнительных эффективных siRNA ALAS1, полученных из таковых, которые уже были идентифицированы, например, AD-58632 и AD-60489. Исследовали эффекты химических модификаций. Химические модификации включают 1) 2'-Ометил- против 2'-фтор-модификаций, 2) снижение 2'Uf (2'-фтор-модификации), 3) добавление PS (фосфоротиоата), 4) использование внутренних dT, и/или 5) гликоль-нуклеиновые кислоты (GNA). Не желая быть связанными теорией, модификации могут усиливать эффективность, например, посредством 1) лучшего раскручивания или повышенной нагрузки RISC или 2) лучшим каталитическим захватом цели. Модификации также могут усиливать стабильность таким образом, что соединения могут накапливаться и функционировать эффективнее при введении нескольких доз.

Повышенную активность относительно других дуплексов (например, AD-58632 и/или AD-60489) наблюдали в некоторых случаях (см. табл. 22В), в то время как в других случаях наблюдали подобную активность (см. табл. 23) или сниженную активность (табл. 24). Эти случаи представлены лишь в качестве примеров на основании скрининга более чем 150 siRNA. В данном документе представлены дополнительные примеры исследований SAR.

Таблица 22В. Повышенная активность относительно исходных соединений

Дуплекс*	IC50	Смысловая (от 5' к 3')	Антисмысловая (от 5' к 3')
AD-		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96 (SEQ ID	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
58632.10	0,017	NO: 4192)	(SEQ ID NO: 4193)
(исходное)			
		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96 (SEQ ID NO:	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg (SEQ
AD- 80643.1	0,004	4194)	ID NO: 4195)
AD-	ı	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96 (SEQ ID	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
60489.3	0.010	NO: 4196)	(SEQ ID NO: 4197)
(исходное)	0,010		
		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu
AD- 60879.1	0,001	(SEQ ID NO: 4198)	(SEQ ID NO: 4199)

<sup>\*</sup>Число после десятичной точки в названии дуплекса в этой и других таблицах относится просто к серийному номеру изделия.

Таблица 23. Подобная активность относительно исходных соединений и повышенная стабильность

Дуплекс	IC50	Смысловая (от 5' к 3')	Антисмысловая (от 5' к 3')
AD-	0,017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg (SEQ
58632.10		(SEQ ID NO: 4200)	ID NO: 4201)
(исходное			
AD-	0,014	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96 (SEQ ID	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg (SEQ ID
60839.1		NO: 4202)	NO: 4203)

Таблица 24. Сниженная активность относительно исходных соединений

	Антисмысловая (от 5' к 3')	Смысловая (от 5' к 3')	IC50	Дуплекс
(SEQ	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg (SEC ID NO: 4205)	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 4204)	0,017	AD- 58632.10
	ID NO. 4209)	ID NO. 4204)		(исходное)
susa —	asAfsqAf(Agn)GfaUfqAfqacAfcUfcUfuUfcsusq	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96 (SEQ ID	0.801	АД-
luog	(SEQ ID NO: 4207)	NO: 4206)	0,001	60886.1
	(SEQ ID NO: 4207)	NO: 4206)		60886.1

Пример 24. In vitro исследования связи структура-активность AD-58632

Получали AD-58632 и производные siRNA AD-58632 и некоторые siRNA отслеживали in vitro в отношении активности. Сокращения химических модификаций представлены в табл.1. In vitro активность при 10 и 0,1 нМ siRNA

In vitro активность siRNA в подавлении mRNA ALAS1 исследовали в клетках Hep3B, которые трансфицировали с использованием Lipofectamine2000 в качестве средства трансфекции. Эксперименты проводили при указанных концентрациях siRNA (например, 0,1, 10 нМ) и анализировали при помощи анализа с разветвленной ДНК (bDNA) через 24 ч после трансфекции. Результаты выражали в виде процента оставшейся mRNA относительно siRNA AD-1955, нецелевой siRNA, которую использовали в качестве отрицательного контроля.

Последовательности siRNA и результаты in vitro исследования представлены в табл. 25, 26 и 27. Таблица 25. Последовательности и результаты in vitro скрининга для siRNA AD-58632 и siRNA производных AD-58632

				*					
SEQ ID NO: (смысловая )	SEQ ID NO: (анти- смысл овая)	Целевые сайты антисмысл овой последоват ельности NM_000688	Дуплекс*	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность (5:3)	Сред 10 нМ	SD 10 HM	Средн . 0,1 н <b>М</b>	SD 0,1 нМ
4208	4209	873-895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	11.79	2,70	46.65	4,21
4210	4211	873-895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsqAfaGfaUfqAfqacAfcUfcUfuUfcsusq	15.61	4,49	63.49	10.51
4212	4213	873-895	AD-60403.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfcUfuUfcsusg	15.04	6.13	62.59	10,05
4214	4215	873-895	AD-60417.1	GfsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfqAfqAfcAfcUfcUfuUfcsusq	13,96	5.47	66.10	8.21
4216	4217	873-895	AD-60417.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	12.59	3.03	41,47	3,77
4218	4219	873-895	AD-60423.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	13.79	3,38	55.93	7.90
4220	4221	873-895	AD-60423.2	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfqAfqAfcAfcUfcUfuUfcsusq	14.74	2.76	48.68	6.64
4222	4223	873-895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfqAfqAfcAfcUfcUfuUfcsusq	28.31	8.68	77.01	3,99
4224	4225	873-895	AD-60440.1	gsasaagaGuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfqAfqAfcAfcUfcUfuUfcsusq	39.90	5.67	99.64	8,58
4226	4227	873-895	AD-60406.1	gsasaagaguGucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	56.06	2.08	95.83	17.01
4228	4229	873-895	AD-60400.1	GfsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	43.09	2.23	87.52	8,10
4230	4231	873-895	AD-60412.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcsusg	65.84	7.75	108.07	21,88
4232	4233	873-895	AD-60416.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfaAfgAfgAfcucuuUfcsusg	45.51	11.82	84.40	10,69
4234	4235	873-895	AD-60424.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcucuuucsusg	63.96	13.25	81.21	1.96
4236	4237	873-895	AD-60429.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfauqAfqAfcAfcucuuucsusq	80.12	10,02	95,33	23.09
4238	4237	873-895	AD-60435.1	gsasaagaGiuGiucucaucuucuuL96 gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96		63.29	17,48	97.07	8.04
4238	4239	873-895	AD-60441.1 AD-60401.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96 gsasaaGfAfGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	55.27	10,48	109.06	4,23
4242	4243	873-895	AD-60407.1	GfsasaaGfAfGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	47,39 55.60	1,88 11.65	98,04	22,58
4244	4245	873-895	AD-60413.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg			92,88	5,65
4246	4247	873-895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	20,82	15,07	57,82	8,31
4248	4249	873-895	AD-60425.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	35,58	13,30	73,46	10,91
4250	4251	873-895	AD-60430.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucdTcaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	40,54	1,41	81,87	11,23
4252	4253	873-895	AD-60436.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucudCaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	60,12	11,74	81,51	7,41
4254	4255	873-895	AD-60442.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucdAucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	40,82	12,61	83,06	1,05
4256	4257	873-895	AD-60402.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucadTcuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	62,16	11,24	123,60	6,71
4258	4259	873-895	AD-60408.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaudCuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	45,39	15,50	86,69	6,12
4260	4261	873-895	AD-60414.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucudTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	32,56	3,52	84,21	0,24
4262	4263	873-895	AD-60420.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuudCuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	52,57	10,77	94,45	3,43
4264	4265	873-895	AD-60426.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuucudTL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	52,49	1,91	91,15	14,49
4266	4267	873-895	AD-60431.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	26,66	1,16	73,09	6,83
4268	4269	873-895	AD-60437.1	gsasaaGfaGfuGfudCucadTcuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	32,80	4,58	69,03	3,02
4270	4271	873-895	AD-60443.1	gsasaaGfaGfuGfudCucaucdTucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	35,10	7,10	69,92	17,93

4272         4273         873 - 895         AD-60403.1         gsasaaGfaGfuGfuCduCducdTucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg           4274         4275         873 - 895         AD-60409.1         gsasaaGfaGfuGuduCdcAdTcdTucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg           4276         4277         873 - 895         AD-60415.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg           4278         4279         873 - 895         AD-60421.1         gsasaaGfaCfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg           4280         4281         873 - 895         AD-60427.1         gsasaaGfaCfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucususg           4282         4283         873 - 895         AD-60432.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucususg           4284         4285         873 - 895         AD-60432.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucususg           4286         4287         873 - 895         AD-60444.1         gsasaaGfaCfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfauTgAffcAfcucdTuucususg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaCfuGfucucaucuucuucuU-96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucususg           4290         4291         873 - 895<	25,28 30,48 25,28 59,28 34,80	1,68 1,88 7,10 5,83	105,23 72,34 69,53	3,34
4276         4277         873 - 895         AD-60415.1         gsasaaGfacftuGfudCudCadTcdTudCuuL96         asAfsGfafaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg           4278         4279         873 - 895         AD-60421.1         gsasaaGfacftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucuuucsusg           4280         4281         873 - 895         AD-60427.1         gsasaaGfaCftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcuCucuucsusg           4282         4283         873 - 895         AD-60432.1         gsasaaGfaCftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuTuucsusg           4284         4285         873 - 895         AD-60438.1         gsasaaGfaCftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucutuucsusg           4286         4287         873 - 895         AD-60444.1         gsasaaGfaCftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucutuucsusg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaCftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucutuucsusg           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaCftuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfatgAgAfgAfcAfcucutuucsusg	25,28 59,28 34,80	7,10	_	_
4278         4279         873 - 895         AD-60421.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafaGfaTgAfgAfcAfcucuuucsusg           4280         4281         873 - 895         AD-60427.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcdTcuuucsusg           4282         4283         873 - 895         AD-60432.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucsusg           4284         4285         873 - 895         AD-60438.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcudCuuucsusg           4286         4287         873 - 895         AD-60441.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcudcuuucsusg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuuucsusg           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfatgAfgAfcAfc(Tgn)puuucsusg	59,28 34,80	_	69,53	
4280         4281         873 - 895         AD-60427.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcdTcuuucsusg           4282         4283         873 - 895         AD-60432.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucsusg           4284         4285         873 - 895         AD-60438.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucsusg           4286         4287         873 - 895         AD-60444.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaTgAfgAfcAfcucdTuucsusg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuucususg           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuuucsusg	34,80	5.83		10,72
4282         4283         873 - 895         AD-60432.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafaGfaugAfgAfcAfcucdTuucsusg           4284         4285         873 - 895         AD-60438.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafaGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucsusg           4286         4287         873 - 895         AD-60444.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafaGfadTgAfgAfcAfcucdTuucsusg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfaGfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuucususg           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuucususg		_	66,88	0,63
4284         4285         873 - 895         AD-60438.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucsusg           4286         4287         873 - 895         AD-60444.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucdTuucsusg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuucususg           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuucususg		8,13	79,65	11,25
4286         4287         873 - 895         AD-60444.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafaGfaTgAfgAfcAfcucdTuucsusg           4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuuucsusg           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuucsusg	46,78	6,42	79,19	16,72
4288         4289         873 - 895         AD-60404.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfafa(Tgn)gAfgAfcAfcucuuucusug           4290         4291         873 - 895         AD-60410.1         gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96         asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)puuucusug	32,07	9,46	57,87	10,18
4290 4291 873 - 895 AD-60410.1 gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuuucsusg	55,55	10,17	89,52	3,91
	50,06	9,17	93,46	2,56
	44,40	13,93	88,96	6,06
	28,56	7,82	76,36	19,47
4294 4295 873 - 895 AD-60422.1 GfsasAfaGfAlGfuGf(Tgn)cucaucuucuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	40,37	10,86	84,06	12,08
4296 4297 873 - 895 AD-60428.1 GfsasAfaGfAfGfuGfuc(Tgn)caucuucuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	56,81	22,64	92,15	0,26
4298 4299 873 - 895 AD-60433.1 GfsasAfaGfAfGfuGfucuc(Agn)ucuucuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	36,78	5,31	67,92	12,55
4300 4301 873 - 895 AD-60439.1 GfsasAfaGfAfGfuGfucuca(Tgn)cuucuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg  4302 4303 873 - 895 AD-60445.1 GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucTgn)ucuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg  asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	32,81	6,72	77,93	13,33
(3)	13,25 34,74	3,28 11,06	78,08 88,93	4,05 5,19
4304 4305 873 - 895 AD-60451.1 GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucu(Tgn)cuuL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg  4306 4307 873 - 895 AD-60457.1 GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuuc(Tgn)uL96 asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg  asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	41,26	6.16	92,15	0,64
	19,58	7,98	69,67	4,64
4308         4309         873 - 895         AD-60463.1         GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfuCfuUfuCfuAft,96         usAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfuUfsussg           4310         4311         873 - 895         AD-60469.1         CfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfuUfu         asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfuUfgsasc	19,35	9,30	72.30	0.50
4312 4313 873 - 895 AD-60409.1 CfsusAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfuCfuUftL96 asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuAfgsasc	21,60	4,27	76,35	11,71
4312 4315 873 - 895 AD-60474.1 CisusAriaGraGfuGfUfCfuCfaUfcUfuUfL96 asArisgAriaGraUfgAfgacAfcUfcUfcUfuAfgsasc	28,01	4,45	76,55	27,32
4316 4317 873 - 895 AD-60484.1 CfsusUfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuUfL96 asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfcUfaAfgsusg	20,31	3,08	71,99	9,53
4318 4319 873 - 895 AD-60446.1 GfsusUfugfaGfugfUfcfucfaUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuUfuU	18,65	5,11	73,52	17,87
4320 4321 873 - 895 AD-60452.1 GfsasUfuCfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuUfL96 asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfgAfaUfcsusg	28,72	1,21	83,09	15,75
4322 4323 873 - 895 AD-60458.1 GfsasAfuCfuGfuGfUfCfuCfaUfcUfuUfL96 asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcAfgAfuUfcsusg	50,15	13,02	114,93	11,58
4324 4325 873 - 895 AD-60464.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfl.96 (Agn)AfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUflcsusg	35,71	5,07	103,88	3,01
4326 4327 873 - 895 AD-60470.1 GfsasAfaGfaGft/Gft/Cft/Cft/Uft/Uft/L96 asAfs(Ggn)AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus	17,59	0,78	73,15	11,75
g				_
4328 4329 873 - 895 AD-60475.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfruCfuUft.96 asAfsg(Agn)aGfaUfgAfgacAfcUfcUfruUfcsusg	22,07	4,57	68,64	25,12
4330 4331 873 - 895 AD-60480.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCftuUft_96 assArsyAr(Agin)GlaUfyArigadouticutioniditiess	15,54	1,22	66,39	14,34
4332 4333 873 - 895 н.д. GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUftuCfuUftuUftuGe asAfsgAfa(Ggn)aUfgAfgacAfcUfcUfuUfucsusg				
4334 4335 873 - 895 AD-60447.1 G/sasAfaGfaGfuGfUfcfuCfaUfcUfuCfuUft.96 asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus	04.00	4.75	404.00	7.74
4554 4555 875 - 6555 Ab-00447.1 GisasAilaGiaGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuGiuG	31,33	4,75	104,36	7,71
4336 4337 873 - 895 AD-60453.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUft.96 asAfsgAfaGfa(Tgn)gAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15,42	0,90	76,29	0,41
4338 4339 873 - 895 AD-60459.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96 asAfsgAfaGfaUf(Ggn)AfgacAfcUfcUfuUfcsus	27,70	10,91	89,20	3,46
4340 4341 873 - 895 AD-60465.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcCfuUfL96 asAfsgAfaGfaUfg(Agn)gacAfcUfcUfuUfucsusg	28,44	6,84	87,28	5,73
4342 4343 873 - 895 AD-60471.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfuUfuCfuUfuCfuUfuL96 asAfsgAfaGfaUfgAf(Ggn)acAfcUfcUfuUfusus	24,03	8,87	85,86	14,62
4245 972 995 AD 60476 1 Groot for Gride Hickory Little Hause Hard Hard Hard Hard Hard Hard Hard Hard	04.40	5.50	00.70	25.40
4344 4343 873 - 833 AD-00470.11 GisasAiaGiaGiuGioCidCidolicolucido	21,48	5,53	88,73	25,48
4346 4347 873 - 895 AD-60481.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu(Tgn) asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15,18	4,19	68,10	6,86
4348 4349 873 - 895 AD-60486.1 a GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcuCftCfgn)U asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfcuUfcsusg	15,31	0,31	74,06	8,48
Constant of the Charles of the Charl	14.89	1,35	59,22	6,64
4350 4351 873 - 895 AD-60448.1 L96 asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg usAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg usAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg usAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg usAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14,09	1,33	39,22	0,04
4352 4353 873 - 895 AD-60454.1 GSBATIGERIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHIGHI	19,24	5,72	75,90	1,27
4354 4355 873 - 895 AD-60460.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14,91	5,84	60,11	6,01
GfcasAfaGfaGfuGft IfCfuCfal If(Can)\ IfuCful I	12.00	7.52	56.00	11.50
IL90	13,99	7,53	56,83	11,59
4556 4559 875 - 895 AD-60472.1 L96 asAisgAlaGlaDigAlgaCAICOICOILIOITIStisg	12,35	0,60	64,36	11,74
4360 4361 873 - 895 AD-60477.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCf(Agn)UfcUfuCfuU asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15,62	1,76	65,96	7,77
4362 4363 873 - 895 AD-60482.1 GrassAfaGfaGfuGfUfcfu(Cgn)aUfcUfuCfuUf asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	18.58	6,43	66,67	2,31
4302 4303 073 - 033 AD-00402.1 Lg6 asking/file like/file like/file like/file		<u> </u>	<del></del>	_
4304 4305 873 - 895 AD-6046711 fL96 asAisgAlaGlaOlgAlgaCAICOICOILIOTISUSG	34,89	15,62	86,39	6,10
4366 4367 873 - 895 AD-60449.1 G/sassAfaGfaGfuGfUf(Cgn)uCfaUfcUfuUf asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	22,65		80,09	0,75
A368 4360 873 - 895 AD-6M55 1 GFsasAfaGfaGfuGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuCfuUf	31,05	2,82	104,24	23.01
4300 430 873 633 AD30433.1 L96 assistant and a supplied a supplied and a supplied		· ·	-	-
43/1   43/1   8/3 - 895   AU-00401.1   L96	16,30	2,08	85,78	22,00
4372 4373 873 - 895 AD-60467.1 G/sasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf(Tgn)CfuU asAfsg(Agn)aGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	17,77	8,38	82,16	18,92
4374 4375 972 995 AD-60473 1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus	14,64	4,25	61,05	7,88
LSO  Of an Afactactural Machiner (Compiler Compiler Compi	. 1,54	.,25	21,33	+ .,50
4376 4377 873 - 895 H.A. fl.96 asArsgAra(Ggn)aUrigArigacArcurcurtururcsusg				
4378 4379 873 - 895 AD-60483.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfa(Tgn)cUfuCfuUf asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGfaGfaGfuGfUfcfuCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaCfaC	26,18	2,83	91,12	16,03
4380 4381 972 905 AD 60488 1 GSsasAfaGfaGfuGfUfCfuCf(Agn)UfcUfuCfuU as AfgaAfaGfa/facAfgl/facA	24,74	0,56	87,66	7,90
IFAO	,,,-	1 5,55	1 5.,55	1 .,50
4382 4383 873 - 895 AD-60450.1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu(Cgn)aUfcUfuCfuUf asAfsgAfaGfaUf(Ggn)AfgacAfcUfcUfuUfcsus g	37,09	2,89	111,90	1,97
4384 4385 972 995 AD 60456 1 GfsasAfaGfaGfuGfUfcf(Tgn)CfaUfcUfuCfuU seAfcqAfaGfaLffr(Agn)cacAfcllfdLffuLfresusg	41,82	0.60	102,56	11,25
ILUO  GESSAÉGGEGERIGER BEGENUTE BLICTON UCT FALLTE SA SÉGRAÉGGER LITERATE GENERAL GENE				
4300 4307 873 - 895 AD-00402.1 L96 g	38,91	3,89	122,47	35,17
4388 4389 873 - 895 AD-60468.1 GfsasAfaGfaGfuGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuUf asAfsgAfaGfaUfgAfg(Agn)cAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGfaUfgAfg(Agn)cAfcUfcUfuUfcsus asAfsgAfaGfaUfgAfg(Agn)cAfcUfcUfuUfcsus	28,44	3,05	97,09	2,66
4390 4391 873 - 895 AD-60550 1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfsL9 asAfsgAfaGfaLlfoAfgacAfcLlfcUfuLlfcsusg	20,35	0,63	69,13	22,65
Office AtaCtaCtaCtaCtaLtal Herd Head Head Chall the				_
	19,17	8,76	68,86	17,72
L90	25,71	5,66	67,63	27,72
4394   4395   873 - 895   AD-60560.1   GfsasAfaGfaGfuGfUfcfuUfaL9   asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfscUfsuUfscsusg		_	t	<del></del>
4394 4395 873 - 895 AD-60560 1 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfsL9 as Afso AfaGfaLlfn Afnac Afol Ifsol Ifsul Ifsos us n	22,78	7,32	74,11	1,85

Как показано в табл. выше, в данном in vitro скрининге siRNA, которые обеспечивали наибольшее подавление mRNA ALAS1 (более чем 80% подавление, так что оставалось менее 20% mRNA) при концентрации 10 нМ, включали AD-58632, AD-60472, AD-60423, AD-60445, AD-60423, AD-60417, AD-60466, AD-60473, AD-60434, AD-60448, AD-60460, AD-60411, AD-60481, AD-60486, AD-60453, AD-60480, AD-60405, AD-60477, AD-60461, AD-60467, AD-60467, AD-60482, AD-60446, AD-60555, AD-60454, AD-60469 и AD-60463. Кроме того, в данном in vitro скрининге siRNA, которые обеспечивали наибольшее подавление mRNA ALAS1 (более чем 30% подавление, так что оставалось менее 70%

mRNA) при концентрации 0,1 нМ, включали AD-60423, AD-58632, AD-60434, AD-60423, AD-60466, AD-60419, AD-60438, AD-60448, AD-60460, AD-60473, AD-60411, AD-60405, AD-60472, AD-60477, AD-60417, AD-60480, AD-60482, AD-60421, AD-60560, AD-60433, AD-60481, AD-60475, AD-60555, AD-60437, AD-60550, AD-60415, AD-60463 и AD-60443.

Как показано в табл. ниже, исследование дополнительных siRNA показало, что следующие дуплексы обеспечивали более чем 80% подавление при концентрации 10 нМ: AD-58632, AD-60405, AD-60423, AD-60434, AD-60445, AD-60480, AD-60460 и AD-60466, а следующие дуплексы обеспечивали более чем 30% подавление при концентрации 0,1 нм: AD-58632, AD-60405, AD-60423, AD-60434, AD-60419, AD-60480, AD-60460 и AD-60466.

Таблица 26. Дополнительные последовательности и результаты in vitro скрининга для siRNA AD-58632 и siRNA производных AD-58632

SEQ ID	SEQ	Целевые сайты	Название	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность	Средн	SD 10	Средн	SD 0,1
NO:	ID NO:	антисмысловой	дуплекса		(5'-3')	. 10	нМ	. 0,1	нМ
(смысл	(анти-	последовательно				нМ		нМ	
овая)	смысл	сти NM_000688.4							
	овая)								
4398	4399	873 - 895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL9	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	11,8	2,7	46,7	4.2
4400	4401	873 - 895	AD-50032.0 AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15,6	4,5	63,5	4,2 10,5
4402	4403	873 - 895	AD-00403.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	15,6	4,5	65,5	10,5
4404	4405	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4406	4407	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4408	4409	873 - 895	AD-60423.2	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	13,8	3,4	55,9	7,9
4410	4411	873 - 895	71D-00420.2	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	10,0	0,4	33,3	7,5
4412	4413	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4414	4415	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4416	4417	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4418	4419	873 - 895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	14,7	2,8	48,7	6,6
4420	4421	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4422	4423	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4424	4425	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4426	4427	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4428	4429	873 - 895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	20,8	15,1	57,8	8,3
4430	4431	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4432	4433	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4434	4435	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4436	4437	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4438	4439	873 - 895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	13,3	3,3	78,1	4,0
4440	4441	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4442	4443	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4444	4445	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4446	4447	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4448	4449	873 - 895	AD-60480.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL9	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus	15.5	1,2	66.4	142
4450	4451		AD-00400.1	·	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus	15,5	1,2	66,4	14,3
4452	4453	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	g asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus				
		873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	g				
4454	4455	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus				
4456	4457			GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsus				
4458	4459	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucs(Tgns)ucuuL9	g asAfsgAfs(Agns)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcs				
		873 - 895		6	usg				
4460	4461	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL9 6	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4462	4463	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4464	4465	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4466	4467	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4468	4469	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4470	4471	873 - 895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucs(Tgns)ucuuL9	asAfsgAfs(Agns)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4472	4473			GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL9	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	11,8			
4474	4475	873 - 895	AD-58632.8	6 GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL9		11,0	2,7	46,7	4,2
		873 - 895		6	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				L
4476	4477	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL9	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4478	4479			GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL9	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4480	4481	873 - 895		6 GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsuCfsuUf					
		873 - 895		sL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4482	4483	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsucsuUfs	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4484	4485			GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4486	4487	873 - 895	AD-60460.1	L96 GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf		14,9	5,8	60,1	6,0
		873 - 895		L96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				L
4488	4489	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4490	4491			GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
	4493	873 - 895		L96 GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)suCfsu					<u> </u>
4492					asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				

4494	4495	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)sucsu UfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4496	4497	873 - 895	AD-60466.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfu UfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14,0	7,5	56,8	11,6
4498	4499	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfu UfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4500	4501	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfu UfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4502	4503	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfu UfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4504	4505	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsuCfs uUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4506	4507	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)Ufsucs uUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				

Таблица 27. Дополнительные последовательности siRNA производных AD-58632

	i , ,	Целевые сайты	Г		<u> </u>
SEQ ID NO: (смыслова я)	SEQ ID NO: (анти- смыслова я)	антисмысловой последовательнос ти NM_	Названи е дуплекс а	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
4508	4509	873 - 895	AD- 58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc U fuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfc U fcUfuUfcsusg
4510	<b>4</b> 511	873 - 895	AD- 60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuu C fuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfc U fcUfuUfcsusg
4512	<b>4</b> 513	873 - 895	AD- 60887	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuu C fuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAf cu cuuucsusg
4514	<b>4</b> 515	873 - 895	AD- 60923	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuu C fuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc Afc UfcUfuUfcsusg
4516	<b>4</b> 517	873 - 895	AD- 60434.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuu L9 6	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc Afc UfcUfuUfcsusg
<b>4</b> 518	<b>4</b> 519	873 - 895	AD- 60892	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuu L9 6	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAf cu cuuucsusg
4520	4521	873 - 895	AD- 60891	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuu L9 6	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfc U fcUfuUfcsusg
4522	4523	873 - 895	AD- 60 <b>4</b> 19.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuu cu uL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAf c ucuuucsusg
4524	4525	873 - 895	AD- 60924	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuu cu uL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc Af cUfcUfuUfcsusg
4526	4527	873 - 895	AD- 60885	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuu cu uL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfc UfcUfuUfcsusg
4528	4529	873 - 895	AD- 60445.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tg n)u cuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAf c ucuuucsusg
4530	4531	873 - 895	AD- 60925	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tg n)u cuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc Af cUfcUfuUfcsusg
4532	4533	873 - 895	AD- 60890	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tg n)u cuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfc U fcUfuUfcsusg
4534	4535	873 - 895	AD- 60926	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc Uf uCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc Af cUfcUfuUfcsusg

## IC50 на основе активности in vitro

Аналогично экспериментам, описанным выше, проводили дополнительные эксперименты дозаютвет при конечной концентрации дуплексов 10, 1,66667, 0,277778, 0,046296, 0,007716, 0,001286, 0,000214 и 3,57E-05 нМ и рассчитывали величины IC50.

Таблица 28. Дополнительные последовательности и IC50 siRNA AD-58632 и siRNA производных AD-58632

SEQ ID NO: (смыслова я)	SEQ ID NO: (анти- смыслова я)	Целевые сайты антисмысло вой последоват ельности NM_000688.	Название	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность (5'-3')	IC50
4536	4537	873 - 895	AD-58632.10	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,017
4538	4539	873 - 895	AD-60405.2	GfsasAfaGfaGfuGfuCfu CfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,070
4540	4541	873 - 895	AD-60887.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfu CfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAf cAfcucuuucsusg	0,120
4542	4543	873 - 895	AD-60819.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfu CfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg	0,009
4544	4545	873 - 895	AD-60823.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfu CfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgac Afcucuuucsusg	0,032
4546	4547	873 - 895	AD-60423.3	gsasaagaGfuGfuCfuCfa ucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgA fcAfcUfcUfuUfcsusg	0,020
4548	4549	873 - 895	AD-60889.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfa ucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAf cAfcucuuucsusg	0,242
4550	4551	873 - 895	AD-60827.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfa ucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg	0,044
4552	4553	873 - 895	AD-60831.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfa ucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgac Afcucuuucsusg	0,077
4554	4555	873 - 895	AD-60434.2	gsasaagaGfuGfuCfucau cuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgA fcAfcUfcUfuUfcsusg	0,028
4556	4557	873 - 895	AD-60891.1	gsasaagaGfuGfuCfucau cuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,078
4558	4559	873 - 895	AD-60892.1	gsasaagaGfuGfuCfucau cuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAf cAfcucuuucsusg	0,138
4560	4561	873 - 895	AD-60835.1	gsasaagaGfuGfuCfucau cuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg	0,015
4562	4563	873 - 895	AD-60839.1	gsasaagaGfuGfuCfucau cuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgac Afcucuuucsusg	0,014
4564	4565	873 - 895	AD-60419.2	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAf cAfcucuuucsusg	0,014
4566	4567	873 - 895	AD-60885.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,091
4568	4569	873 - 895	AD-60419.3	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAf cAfcucuuucsusg	0,026
4570	4571	873 - 895	AD-60843.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg	0,004
4572	4573	873 - 895	AD-60847.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgac Afcucuuucsusg	0,012

4574	4575	873 - 895	AD-60445.2	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc auc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAf cAfcucuuucsusg	0,077
4576	4577	873 - 895	AD-60890.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc auc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	1,201
4578	4579	873 - 895	AD-60445.3	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc	asAfsGfAfaGfaugAfgAf	0,302
4580	4581	873 - 895	AD-60820.1	auc(Tgn)ucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfucuc	cAfcucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgAfc	0.006
			-	auc(Tgn)ucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfucuc	Afcucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgac	
4582	4583	873 - 895	AD-60824.1	auc(Tgn)ucuuL96 GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu	Afcucuuucsusg asAfsgAf(Agn)GfaUfgA	0,032
4584	4585	873 - 895	AD-60480.2	CfaUfcUfuCfuUfL96	fgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,066
4586	4587	873 - 895	AD-60893.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfa ucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgA fgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,034
4588	4589	873 - 895	AD-60884.1	gsasaagaGfuGfuCfucau cuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgA fgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,157
4590	<b>4</b> 591	873 - 895	AD-60886.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgA fgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,801
4592	4593	873 - 895	AD-60888.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc auc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgA fgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,201
4594	4595	873 - 895	AD-60828.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc aucs(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaUf gAfgacAfcUfcUfuUfcsu	0,145
4596	4597	873 - 895	AD-60832.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu	sg asAfsgAf(Agn)GfaugAf	0,036
				CfaUfcUfuCfuUfL96 gsasaagaGfuGfuCfuCfa	gacAfcucuuucsusg asAfsqAf(Aqn)GfauqAf	
4598	4599	873 - 895	AD-60836.1	ucuucuuL96 gsasaagaGfuGfuCfucau	gacAfcucuuucsusg asAfsgAf(Agn)GfaugAf	0,076
4600	4601	873 - 895	AD-60840.1	cuucuuL96	gacAfcucuuucsusg	0,033
4602	4603	873 - 895	AD-60844.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAf gacAfcucuuucsusg	0,017
4604	4605	873 - 895	AD-60848.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc auc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAf gacAfcucuuucsusg	0,007
4606	4607	873 - 895	AD-60821.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc aucs(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)Gfaug AfgacAfcucuuucsusg	0,076
4608	4609	873 - 895	AD-58632.11	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,063
4610	4611	873 - 895	AD-60825.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,031
4612	4613	873 - 895	AD-60829.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,033
4614	4615	873 - 895	AD-60833.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,100
4616	4617	873 - 895	AD-60837.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUfcUfsuCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,031
4618	4619	873 - 895	AD-60841.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUfcUfsucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfga cAfcdTcUfuUfcsusg	0,010
4620	4621	873 - 895	AD-60460.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,009
4622	4623	873 - 895	AD-60845.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,002
4624	4625	873 - 895	AD-60849.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,005
4626	4627	873 - 895	AD-60822.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf	asAfsgAfaGfaUfgAfgac	0,007
4628	4629	873 - 895	AD-60826.1	uCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96 GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUfc(Tgn)suCfsuUfs	AfcdTcUfuUfcsusg  asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,009
4630	4631	972 PNE	AD-60830.1	L96 GfsasAfaGfaGfuGfdTCf	asAfsGfAfaGfaUfgAfga	0.010
4630	4031	873 - 895	AD-00030.1	uCfaUfc(Tgn)sucsuUfsL 96	cAfcdTcUfuUfcsusg	0,019
4632	4633	873 - 895	AD-60466.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,066
4634	4635	873 - 895	AD-60834.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL9 6	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg	0,024
4636	4637	873 - 895	AD-60838.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,013
4638	4639	873 - 895	AD-60842.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL9 6	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,010
4640	4641	873 - 895	AD-60846.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCf uCfaUf(Cgn)UfsuCfsuUf sL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcdTcUfuUfcsusg	0,011
				GfsasAfaGfaGfuGfdTCf	asAfsGfAfaGfaUfgAfga	

Как показано в табл. 28, следующие дуплексы характеризовались IC50 менее чем 0,01 нМ: AD-60845, AD-60843, AD-60849, AD-60820, AD-60848, AD-60822, AD-60826, AD-60819, AD-60460.

Следующие дуплексы характеризовались IC50 менее чем 0,02 нМ: AD-60845, AD-60843, AD-60849, AD-60820, AD-60848, AD-60822, AD-60826, AD-60819, AD-60460, AD-60841, AD-60842, AD-60846, AD-60847, AD-60838, AD-60419, AD-60839, AD-60835, AD-586320, AD-60844, AD-60850 и AD-60830.

Следующие дуплексы характеризовались IC50 менее чем 0,05 нМ: AD-60845, AD-60843, AD-60849, AD-60820, AD-60848, AD-60822, AD-60826, AD-60819, и AD-60460, AD-60841, AD-60842, AD-60846, AD-60847, AD-60838, AD-60419, AD-60839, AD-60835, AD-586320, AD-60844, AD-60850, AD-60830, AD-60423, AD-60834, AD-60419, AD-60434, AD-60825, AD-60837, AD-60823, AD-60824, AD-60840, AD-60829, AD-60893, AD-60832 и AD-60827.

Пример 25. In vivo исследования связи структура-активность AD-58632

Получали производные исходной siRNA AD-58632 и подвергали скринингу in vivo на крысах. Последовательности siRNA, которые отслеживали, представлены в табл. ниже.

Таблица 29. Последовательности дуплексов siRNA ALAS1

				, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	1
SEQ ID NO: (смысло вая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5′-3′)
4644	4645	873 - 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfC fuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAf cUfcUfuUfcsusg
4646	4647	873 - 895	AD-60405	GfsasAfaGfaGfuGfuCf uCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAf cUfcUfuUfcsusg
4648	4649	873 - 895	AD-60887	GfsasAfaGfaGfuGfuCf uCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcA fcucuuucsusg
4650	4651	873 - 895	AD-60923	gsasaagaGfuGfuCfuca ucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg
4652	4653	873 - 895	AD-60434	gsasaagaGfuGfuCfuca ucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg
4654	4655	873 - 895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfuca ucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcA fcucuuucsusg
4656	4657	873 - 895	AD-60419	GfsasAfaGfAfGfuGfdT cucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcA fcucuuucsusg
4658	4659	873 - 895	AD-60924	GfsasAfaGfAfGfuGfdT cucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg
4660	4661	873 - 895	AD-60445	GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcA fcucuuucsusg
4662	4663	873 - 895	AD-60925	GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg
4664	4665	873 - 895	AD-60926	GfsasAfaGfaGfuGfUfC fuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg

Вводили разовую дозу 5 мг/кг siRNA. Через 5 дней после введения siRNA, проводили измерения уровней mRNA, mRNA ALAS1 крыс (rALAS1) и mRNA GAPDH крыс (rGAPDH), при помощи анализа с bDNA, и уровни лекарственного средства в ткани определяли при помощи qPCR. Результаты представлены на фиг. 33 и 34. Как показано на фиг. 33, по меньшей мере десять дуплексов (AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925 и AD-60926), которые отслеживали, характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с AD-58632. Кроме того, как показано на фиг. 34, эти дуплексы (за исключением AD-60926) обеспечивали более высокие концентрации в печени, чем AD-58632.

Пример 26. Эффективность AD-60925 и AD-60926 в крысиной модели AIP

Терапевтическую эффективность AD-60925 и AD-60926 (описанных в предыдущем примере) исследовали на крысиной модели AIP. Схема эксперимента показана вверху фиг. 35. Крыс обрабатывали PBS или 3 мг/кг siRNA ALAS1-GalNAc t.i.w., фенобарбиталом (PB) и siRNA PBGD в составе LNP с AF11 (AF11-PBGD) в периоды времени, указанные на фиг. 35. Контрольные крысы получали только siRNA PBGD без индукции фенобарбиталом.

Результаты показаны на фиг. 35, 36 и 37. Введение фенобарбитала индуцировало экспрессию mRNA ALAS1 и повышало уровни PBG и ALA в моче по сравнению с контролем. Обработка суммарно восемью дозами в 3 мг/кг AD-60925 или AD-60926 три раза в неделю подавляла mRNA ALAS1 (фиг. 35), PBG в моче (фиг. 36 и 37, вверху) и ALA в моче (фиг. 36 и 37, внизу). Фенобарбитал индуцировал повышения mRNA ALAS1, PBG и ALA в моче. Динамика эффектов лечения показана на фиг. 37. Стрелки указывают на временные точки при введении PB. Обработка siRNA предупреждала индуцированные фенобарбиталом повышения mRNA ALAS1, PBG и ALA в моче.

Как AD-60925, так и AD-60926 характеризовались терапевтической эффективностью лечения AIP. AD-60925 был более эффективным, чем AD-60926 в подавлении mRNA ALAS1, ALA в моче и PBG в моче.

Пример 27. Дополнительные in vivo исследования связи структура-активность AD-58632 Получали производные исходной siRNA AD-58632 и подвергали скринингу in vivo на крысах.

## In vivo скрининг, часть I

Последовательности siRNA, которые подвергали скринингу, представлены в таблице ниже.

Таблица 30. Последовательности дуплексов siRNA ALAS1

SEQ ID NO: (смысло вая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
4666	4667	873 – 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfC fuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcU fcUfuUfcsusg
4668	4669	873 - 895	AD-60820	GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcu cuuucsusg
4670	4671	873 - 895	AD-60824	GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcuc uuucsusg
4672	4673	873 - 895	AD-61137	GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcsusg
4674	4675	873 - 895	AD-60843	GfsasAfaGfAfGfuGfdT cucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcu cuuucsusg
4676	4677	873 - 895	AD-60847	GfsasAfaGfAfGfuGfdT cucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcuc uuucsusg
4678	4679	873 - 895	AD-61138	GfsasAfaGfAfGfuGfdT cucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcsusg
4680	4681	873 - 895	AD-60819	GfsasAfaGfaGfuGfuCf uCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcu cuuucsusg
4682	4683	873 - 895	AD-60823	GfsasAfaGfaGfuGfuCf uCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcuc uuucsusg
4684	4685	873 - 895	AD-61139	GfsasAfaGfaGfuGfuCf uCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcsusg
4686	4687	873 - 895	AD-61140	GfsasAfaGfaGfuGfdTC fuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL 96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcu cuuucsusg

Крысам вводили четыре дозы по 2,5 мг/кг siRNA дважды в неделю (два раза в неделю) в течение двух недель. Через 72 ч после введения последней дозы siRNA животных выводили из эксперимента и выполняли измерения уровней mRNA ALAS1 крыс (rALAS1) и mRNA GAPDH крыс (rGAPDH) при помощи анализа с bDNA.

Как показано на фиг. 38, по меньшей мере четыре из siRNA (AD-60820, AD-60843, AD-60819 и AD-61140), которые исследовали, характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с AD-58632.

# In vivo скрининг, часть II

Последовательности siRNA, которые подвергали скринингу, представлены в табл. ниже. Таблица 31. Последовательности дуплексов siRNA ALAS1

SEQ ID NO: (смысло вая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
4688	4689	873 - 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfC fuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgac AfcUfcUfuUfcsusg
4690	4691	873 - 895	AD-61141.2	GfsasAfaGfaGfuGfdTC fuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL 96	asAfsgAfaGfaugAfgacA fcucuuucsusg
4692	4693	873 - 895	AD-61142.2	GfsasAfaGfaGfuGfdTC fuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL 96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg
4694	4695	873 - 895	AD-60835	gsasaagaGfuGfuCfuca ucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg
4696	4697	873 - 895	AD-60839	gsasaagaGfuGfuCfuca ucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacA fcucuuucsusg
4698	4699	873 - 895	AD-61143.2	gsasaagaGfuGfuCfuca ucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg
4700	4701	873 - 895	AD-61144.1	gsasaagaGfuGfdTCfuc aucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg
4702	4703	873 - 895	AD-61145.1	gsasaagaGfuGfdTCfuc aucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacA fcucuuucsusg
4704	4705	873 - 895	AD-61146.1	gsasaagaGfuGfdTCfuc aucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcsusg

Крысам вводили разовую дозу 2,5 мг/кг siRNA. Через 72 ч после введения siRNA измерения уров-

ней mRNA, mRNA ALAS1 крыс (rALAS1) и mRNA GAPDH крыс (rGAPDH) выполняли при помощи анализа с bDNA.

Как показано на фиг. 39, siRNA AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145 и AD-61146 характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с AD-58632. siRNA, которая обеспечивала наибольшее подавление в этом эксперименте, была AD-60835.

Пример 28. In vitro исследования связи структура-активность AD-60489

Получали AD-60489 и производные siRNA AD-60489 и некоторые siRNA подвергали скринингу in vitro в отношении активности. In vitro активность siRNA в подавлении mRNA ALAS1 исследовали, как описано в примере 24. Последовательности siRNA и результаты in vitro исследования представлены ниже в таблицах.

Таблица 32. Последовательности и результаты in vitro скрининга для siRNA AD-60489 и siRNA производных AD-60489

05010		T., *		На производных Ат					_
SEQ ID NO: (смысл овая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса*	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность (5'-3')	Средн. 10 нМ	SD 10 н <b>M</b>	Средн. 0,1 нМ	SD 0,1 н <b>M</b>
4706	4707	871 - 893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfg sqsu	17,02	0,18	50,65	5,11
4708	4709	871 - 893	AD-60495.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc uuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfg sgsu	17,13	5,94	63,58	18,6
4710	4711	871 - 893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc uuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	11,90	0,66	45,19	8,93
4712	4713	871 - 893	AD-60507.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucu uAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	14,63	7,85	48,50	19,5
4714	4715	871 - 893	AD-60513.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucu uaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	14,39	2,44	51,03	7,01
4716	4717	871 - 893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu aL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	14,67	4,88	51,70	7,72
4718	4719	871 - 893	AD-60525.1	csasgaaaGfaGfuguCfuCfaucuua	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	45,24	18,16	105,09	14,1
4720	4721	871 - 893	AD-60531.1	csasgaaaGfaGfugucuCfaucuuaL 96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	62,19	12,47	107,18	1,37
4722	4723	871 - 893	AD-60490.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL9	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcU fgsgsu	39,06	10,92	82,70	10,6
4724	4725	871 - 893	AD-60496.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL9	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcu gsgsu	48,90	1,85	71,55	5,47
4726	4727	871 - 893	AD-60502.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL9	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuucug sqsu	51,83	12,62	81,85	4,25
4728	4729	871 - 893	AD-60508.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL9 6	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcuuucugs gsu	65,34	21,75	89,23	11,0
4730	4731	871 - 893	AD-60514.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL9 6	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcucuuucugsg su	97,13	3,47	102,94	7,36
4732	4733	871 - 893	AD-60520.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL9 6	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgs u	104,97	0,93	126,75	20,4
4734	4735	871 - 893	AD-60526.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgs u	61,48	15,44	81,28	7,99
4736	4737	871 - 893	AD-60532.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	83,47	13,36	94,13	8,11
4738	4739	871 - 893	AD-60491.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	109,05	0,43	97,85	9,77
4740	4741	871 - 893	AD-60497.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	73,81	10,17	95,01	5,40
4742	4743	871 - 893	AD-60503.1	csasgaaaGfAfGfudGucucaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	75,30	11,29	96,03	6,30
4744	4745	871 - 893	AD-60509.1	csasgaaaGfAfGfugudCucaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	71,37	24,41	104,36	18,6 2
4746	4747	871 - 893	AD-60515.1	csasgaaaGfAfGfugucudCaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	64,16	13,95	98,80	0,92
4748	4749	871 - 893	AD-60521.1	csasgaaaGfAfGfugucucadTcuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	73,99	36,39	99,96	7,29
4750	4751	871 - 893	AD-60527.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucdTua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	82,69	26,56	114,13	4,81
4752	4753	871 - 893	AD-60533.1	csasgaaaGfAfGfudGudCucaucu uaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	89,41	4,69	107,40	9,67
4754	4755	871 - 893	AD-60492.1	csasgaaaGfAfGfudGucudCaucu uaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	83,52	1,56	100,70	0,79
4756	4757	871 - 893	AD-60498.1	csasgaaaGfAfGfudGucucadTcuu aL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	64,64	16,21	98,41	19,6 0
4758	4759	871 - 893	AD-60504.1	csasgaaaGfAfGfudGudCucadTc uuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	57,55	5,13	93,14	0,41
4760	4761	871 - 893	AD-60510.1	csasgaaaGfAfGfudGudCudCadT cuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugs gsu	58,88	25,48	91,39	2,06
4762	4763	871 - 893	AD-60516.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucug sgsu	53,24	6,56	84,40	2,73
4764	4765	871 - 893	AD-60522.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuua L96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucug sgsu	67,17	6,48	91,62	5,43
4766	4767	871 - 893	AD-60528.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuua L96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucug sgsu	81,44	37,04	89,71	8,60
4768	4769	871 - 893	AD-60534.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcdTuucug sgsu	62,63	20,55	99,62	7,37
4770	4771	871 - 893	AD-60493.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuudTcug sgsu	107,18	0,11	87,98	2,41
4772	4773	871 - 893	AD-60499.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcu gsgsu	35,92	13,78	77,52	6,68
4774	4775	871 - 893	AD-60505.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL 96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuuucu gsgsu	66,77	16,45	109,82	2,48
4776	4777	871 - 893	AD-60511.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuuucu gsgsu	82,10	10,11	95,50	14,7
4778	4779	871 - 893	AD-60517.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuuucu gsgsu	80,83	29,69	93,57	18,4 1
4780	4781	871 - 893	AD-60523.1	GfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfc scsa	29,60	1,64	67,16	8,40
4782	4783	871 - 893	AD-60529.1	GfsusGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcAfc scsa	21,15	1,21	79,02	28,9 9
4784	4785	871 - 893	AD-60535.1	GfsusCfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfgAfc scsa	31,78	13,54	79,36	26,5 6
4786	4787	871 - 893	AD-60494.1	GfsusCfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfgAfc sgsu	30,14	3,42	81,46	12,8 8
4788	4789	871 - 893	AD-60500.1	CfsusCfuAfaGfaGfUfGfuCfuCfaU fcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuAfgAfg sgsu	29,85	11,78	72,14	4,56
4790	4791	871 - 893	AD-60506.1	CfsusCfuUfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfaAfgUfg sgsu	19,06	1,98	88,93	11,1

Таблица 33. Последовательности и результаты in vitro скрининга для siRNA AD-60489 и siRNA производных AD-60489

				P					
4792	4793	871 - 893	AD-60512.1	CfsusGfuUfuGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcAfaAfcUfg sgsu	29,71	1,79	86,32	17,6 9
4794	4795	871 - 893	AD-60518.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	(Tgns)AfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu	27,47	2,59	81,03	10,9 3
4796	4797	871 - 893	AD-60524.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfs(Agn)GfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu	17,02	1,39	71,65	17,4 2
4798	4799	871 - 893	н.д.	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsa(Ggn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfc Ufgsgsu				
4800	4801	871 - 893	AD-60536.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGf(Agn)aUfgAfgAfcacUfcUfuU fcUfgsgsu	61,77	10,19	91,55	2,20
4802	4803	871 - 893	AD-60541.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfa(Tgn)gAfgAfcacUfcUfuUfc Ufgsgsu	25,47	2,83	54,36	15,0 2
4804	4805	871 - 893	AD-60546.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUf(Ggn)AfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu	49,32	1,50	90,79	11,3 6
4806	4807	871 - 893	AD-60551.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfg(Agn)gAfcacUfcUfuUfc Ufgsgsu	24,37	1,11	76,80	24,9 9
4808	4809	871 - 893	AD-60556.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAf(Ggn)AfcacUfcUfuUf cUfgsgsu	21,43	4,71	61,90	5,64
4810	4811	871 - 893	AD-60561.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfg(Agn)cacUfcUfuUfc Ufgsgsu	28,25	6,41	71,84	27,0 1
4812	4813	871 - 893	AD-60566.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAf(Cgn)acUfcUfuUf cUfgsgsu	27,57	4,87	67,91	18,2
4814	4815	871 - 893	AD-60570.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Agn)cUfcUfuUf cUfgsgsu	24,11	0,04	58,75	21,0
4816	4817	871 - 893	AD-60583.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfu(Agn)L96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susa	15,32	4,78	42,01	9,51
4818	4819	871 - 893	AD-60585.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUf(Tgn)AfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	21,15	4,14	49,54	13,3
4820	4821	871 - 893	AD-60587.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa Ufc(Tgn)uAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susq	14,66	1,73	41,47	13,2
4822	4823	871 - 893	AD-60589.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa Uf(Cgn)UfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	20,77	5,12	43,97	15,6
4824	4825	871 - 893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa( Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susq	13,66	0,05	36,42	16,9 4
4826	4827	871 - 893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(A gn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susq	13,35	4,11	35,43	11,3
4828	4829	871 - 893	AD-60593.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn )aUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	15,13	0,28	39,99	19,3
4830	4831	871 - 893	AD-60582.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCf(Tgn) CfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	19,56	8,17	51,59	1,11
4832	4833	871 - 893	AD-60584.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu(Cgn)uC faUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susq	23,36	6,63	58,79	10,3
4834	4835	871 - 893	AD-60586.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Tgn)Cfu CfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	27,78	2,20	76,86	6,81
4836	4837	871 - 893	AD-60588.1	CfsasGfaAfaGfaGfUf(Ggn)uCfuC faUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	105,27	14,25	99,26	19,6 2
4838	4839	871 - 893	AD-60590.1	CfsasGfaAfaGfaGf(Tgn)GfuCfuC	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc	28,74	1,66	81,88	22,0
4840	4841	871 - 893	AD-60558.1	faUfcUfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa	susg usAfs(Agn)GfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf	22,74	14,85	60,42	19,3
				Ufc(Tgn)uAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa	cUfgsgsu usAfsa(Ggn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfc	22,11	11,00	00,12	8
4842	4843	871 - 893	н.д.	Uf(Cgn)UfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(	Ufgsgsu usAfsaGf(Agn)aUfgAfgAfcacUfcUfuU				16,4
4844	4845	871 - 893	AD-60568.1	Tgn)cUfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(A	fcUfgsgsu	86,66	21,93	110,05	4
4846	4847	871 - 893	AD-60572.1	gn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfa(Tgn)gAfgAfcacUfcUfuUfc Ufgsgsu	22,37	4,86	71,24	22,1 9
4848	4849	871 - 893	AD-60539.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn )aUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUf(Ggn)AfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu	43,35	14,53	104,44	2,51
4850	4851	871 - 893	AD-60544.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCf(Tgn) CfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfg(Agn)gAfcacUfcUfuUfc Ufgsgsu	25,85	1,18	69,98	5,86
4852	4853	871 - 893	AD-60549.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu(Cgn)uC faUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAf(Ggn)AfcacUfcUfuUf cUfgsgsu	29,40	4,62	72,98	20,1 6
4854	4855	871 - 893	AD-60554.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Tgn)Cfu CfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfg(Agn)cacUfcUfuUfc Ufgsgsu	33,74	0,45	75,36	19,3 9
4856	4857	871 - 893	н.д.	CfsasGfaAfaGfaGfUf(Ggn)uCfuC faUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAf(Cgn)acUfcUfuUf cUfgsgsu				
4858	4859	871 - 893	AD-60564.1	CfsasGfaAfaGfaGf(Tgn)GfuCfuC faUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Agn)cUfcUfuUf cUfgsgsu	27,77	10,34	77,01	11,5 1
l		871 - 893	AD-60569.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfg sgsu	20,34	5,29	59,40	19,7 4
4860	4861								14,9
4860 4862	4861	871 - 893	AD-60573.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfg sqsu	20,07	3,83	60,80	3
		871 - 893 871 - 893	AD-60573.1 AD-60540.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfscUfsuAfsL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa UfcUfuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfg sgsu usAfsaGfaUfsgAfgAfcacUfcUfsuUfsc Ufgsgsu	20,07 24,36	3,83 0,56	60,80 75,75	

В in vitro скрининге, для которого результаты показаны в таблицах выше, siRNA, которые обеспечивали наибольшее подавление mRNA ALAS1 (более чем 80% подавления, так что оставалось менее 20% mRNA) при концентрации 10 нМ, включали AD-60501, AD-60592, AD-60591, AD-60513, AD-60507, AD-60587, AD-60519, AD-60593, AD-60583, AD-60524, AD-60489, AD-60495, AD-60506, и AD-60582.

В іп vitro скрининге, для которого результаты показаны в таблицах выше, siRNA, которые обеспечивали наибольшее подавление mRNA ALAS1 (более чем 30% подавления, так что оставалось менее 70% mRNA) при концентрации 0,1 нМ, включали AD-60592, AD-60591, AD-60593, AD-60587, AD-60583, AD-60589, AD-60501, AD-60507, AD-60585, AD-60489, AD-60513, AD-60582, AD-60519, AD-60541, AD-60570, AD-60584, AD-60569, AD-60558, AD-60573, AD-60556, AD-60495, AD-60523, AD-60566 и AD-60544.

Как показано в табл. ниже, исследование дополнительных siRNA показало, что следующие дуплексы обеспечивали более чем 80% подавление при концентрации 10 нМ: AD-60489, AD-60495, AD-60501, AD-60507, AD-60513, AD-60519, AD-60583, AD-60591, AD-60592 и AD-60593, а следующие дуплексы обеспечивали более чем 30% подавление при концентрации 0,1 нм: AD-60489, AD-60495, AD-60501, AD-60507, AD-60513, AD-60519, AD-60583, AD-60591, AD-60592 и AD-60593.

Таблица 34. Дополнительные последовательности siRNA производных AD-60489

SEQ ID NO: (смысловая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательност и NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность (5'-3')	Средн. 10 нМ	SD 10 нM	Средн . 0,1 нМ	SD 0, HM
4868	4869	871 - 893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaU fcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuU fcUfgsgsu	17,0	0,2	50,7	5,1
4870	4871	871 - 893	AD-60495.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc uuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuU fcUfgsgsu	17,1	5,9	63,6	18,6
4872	4873	871 - 893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc uuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfu UfcUfgsgsu	11,9	0,7	45,2	8,9
4874	4875	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc uuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucu gsgsu				
4876	4877	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc uuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				<u> </u>
4878	4879	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc	Tcugsgsu usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				<del>                                     </del>
4880	4881	871 - 893		uuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfauc	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuud				_
4882	4883	871 - 893	AD-60507.1	uuAfL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	Tcugsgsu usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfu	14,6	7,8	48,5	19,6
			AD-00307.1	AfL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	UfcUfgsgsu usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf	14,0	7,0	40,5	19,0
4884	4885	871 - 893		AfL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	cUfgsgsu usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucu				-
4886	4887	871 - 893		AfL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	gsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				<u> </u>
4888	4889	871 - 893		AfL96	Tcugsgsu				
4890	4891	871 - 893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu AfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuud Tcugsgsu				
4892	4893	871 - 893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu AfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuud Tcugsgsu				
4894	4895	871 - 893	AD-60513.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu aL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfu UfcUfgsgsu	14,4	2,4	51,0	7,0
4896	4897	871 - 893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu al 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu				
4898	4899	871 - 893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucu				
4900	4901	871 - 893		aL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	gsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				<del>                                     </del>
4902	4903	871 - 893		aL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	Tcugsgsu usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuud		1		$\vdash$
				aL96 CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuu	Tcugsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuud		1		+-
4904	4905	871 - 893		aL96 csasqaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuua	Tcugsgsu usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfu	1	1		<del> </del>
4906	4907	871 - 893	AD-60519.1	L96	UfcUfgsgsu	14,7	4,9	51,7	7,7
4908	4909	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuua L96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu				
4910	4911	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuua L96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucu				
4912	4913	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuua	gsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				
4914	4915	871 - 893		L96 csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuua	Tcugsgsu usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				
				L96 csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuua	Tcugsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuud				
4916	4917	871 - 893		L96 csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL9	Tcugsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				
4918	4919	871 - 893	AD-60499.1	6	Tcugsgsu	35,9	13,8	77,5	6,7
4920	4921	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL9 6	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf cUfgsgsu				
4922	4923	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL9 6	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfu UfcUfgsgsu				
4924	4925	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL9 6	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucu gsgsu				
4926	4927	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL9 6	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuud Tcugsgsu				
4928	4929	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL9 6	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuud Tcugsgsu				
4930	4931	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuu	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf				
4932	4933	871 - 893		aL96 csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuu	cUfgsgsu usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfu				
4934	4935	871 - 893		aL96 csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuu	UfcUfgsgsu usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucu				
4936	4937			aL96 csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuu	gsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				
		871 - 893		aL96 csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuu	Tcugsgsu usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuud				
4938	4939	871 - 893		aL96 csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuu	Tcugsgsu usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuud				
4940	4941	871 - 893		aL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf	Tcugsgsu asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf				
4942	4943	871 - 893	AD-60583.1	cUfu(Agn)L96	uUfcsusg	15,3	4,8	42,0	9,5
4944	4945	871 - 893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(T gn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf uUfcsusg	13,7	0,0	36,4	16,9
4946	4947	871 - 893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Ag n)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf uUfcsusg	13,4	4,1	35,4	11,4
4948	4949	871 - 893	AD-60593.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn) aUfcUfuAfL96	as∆fsg∆faGfaUfg∆fgac∆fcUfcUf uUfcsusg	15,1	0,3	40,0	19,4
4950	4951	871 - 893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf	17,0	0,2	50,7	5,1
4952	4953	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUf	cUfgsgsu usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUf				
4954	4955			cUfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf	cUfgsgsu usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf				
1004	1 4000	871 - 893		cUfuAfL96	cUfgsgsu	<u> </u>		ليط	
4956	4957	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUf cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf cUfgsgsu				
4958	4959	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUf scUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf cUfgsgsu				
4960	4961	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUf scusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuU fcUfgsgsu				
4962	4963	871 - 893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(T gn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf uUfcsusg	13,7	0,0	36,4	16,9
4964	4965	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(T	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf			$\neg$	
4966	4967	871 - 893		gn)cUfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(T	uUfcsusg usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf				
4968	4969	871 - 893		gn)cUfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(T	cUfgsgsu usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf				
				gn)cUfuAfL96 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(T	cUfgsgsu usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf				
4970	4971	871 - 893		gn)scUfsuAfsL96 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(T	cUfgsgsu usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuU			-+	
4972	4973	871 - 893		gn)scusuAfsL96  CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Ag	fcUfgsgsu asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf				
4974	4975	871 - 893	AD-60592.1	n)UfcUfuAfL96	uUfcsusg	13,4	4,1	35,4	11,4
4976	4977	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Ag n)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUf uUfcsusg				
4978	4979	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Ag n)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf cUfgsgsu				
4980	4981	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Ag n)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf cUfgsgsu				
4982	4983	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Ag n)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf cUfgsgsu			$\neg \neg$	
4984	4985	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Ag	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuU				
4986	4987	871 - 893		n)UfscusuAfsL96 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(A	fcUfgsgsu usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUf			-+	
			-	gns)UfscUfsuAfsL96 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(A	cUfgsgsu usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuU			-	
4988	4989	871 - 893	1	gns)UfscusuAfsL96	fcUfgsgsu				

SEQ ID NO: (смысловая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
4990	4991	871 - 893	AD- 60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu CfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfc UfuUfcUfgsgsu
4992	4993	871 - 893	AD- 60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfu CfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcUfgsgsu
4994	4995	871 - 893	AD- 60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfu CfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
4996	4997	871 - 893	AD- 60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcUfgsgsu
4998	4999	871 - 893	AD- 60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
5000	5001	871 - 893	AD- 60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfc UfuUfcUfgsgsu
5002	5003	871 - 893	AD- 60495.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfc UfuUfcUfgsgsu
5004	5005	871 - 893	AD- 60935.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu CfuCfaUfcUf uAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfc UfuUfcUfgsgsu

Таблица 35. Дополнительные последовательности и IC50 siRNA AD-60489 и siRNA производных AD-60489

						_
SEQ ID NO: (смысловая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса*	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая (AS) последовательность (5'-3')	IC50
5006	5007	871 - 893	AD-60489.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,010
5008	5009	871 - 893	AD-60495.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,254
5010	5011	871 - 893	AD-60501.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0,006
5012	5013	871 - 893	AD-60898.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	н.д.
5014	5015	871 - 893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,151
5016	5017	871 - 893	AD-60851.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,033
5018	5019	871 - 893	AD-60855.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0,065
5020	5021	871 - 893	AD-60507.2	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0,029
5022	5023	871 - 893	AD-60902.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,024
5024	5025	871 - 893	AD-60904.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	н.д.
5026	5027	871 - 893	AD-60894.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,011
5028	5029	871 - 893	AD-60860.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,249
5030	5031	871 - 893	AD-60864.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	1,899
5032	5033	871 - 893	AD-60513.2	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0,019
5034	5035	871 - 893	AD-60896.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,034
5036	5037	871 - 893	AD-60899.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	н.д.
5038	5039	871 - 893	AD-60868.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,249
5040	5041	871 - 893	AD-60872.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0,014
5042	5043	871 - 893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0,026
5044	5045	871 - 893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,080
5046	5047	871 - 893	AD-60903.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	н.д.
5048	5049	871 - 893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,018
5050	5051	871 - 893	AD-60876.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,091
5052	5053	871 - 893	AD-60880.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0,131
5054	5055	871 - 893	AD-60499.2	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	н.д.
5056	5057	871 - 893	AD-60895.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	н.д.
5058	5059	871 - 893	AD-60897.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	н.д.
5060	5061	871 - 893	AD-60526.2	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	н.д.
5062	5063	871 - 893	AD-60852.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	4,970
5064	5065	871 - 893	AD-60856.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	н.д.
5066	5067	871 - 893	AD-60861.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,019
5068	5069	871 - 893	AD-60865.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0,061
5070	5071	871 - 893	AD-60869.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	н.д.
5072	5073	871 - 893	AD-60873.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,009
5074	5075	871 - 893	AD-60877.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0,008
5076	5077	871 - 893	AD-60881.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0,025
5078	5079	871 - 893	AD-60583.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfu(Agn)L9	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,022
5080	5081	871 - 893	AD-60591.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL9	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,031
5082	5083	871 - 893	AD-60592.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,010
5084	5085	871 - 893	AD-60593.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)aUfcUfuAfL 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,006
5086	5087	871 - 893	AD-60489.4	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,011
5088	5089	871 - 893	AD-60857.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0,019
5090	5091	871 - 893	AD-60862.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,012
5092	5093	871 - 893	AD-60866.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,015
5094	5095	871 - 893	AD-60870.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL9 6	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,012
5096	5097	871 - 893	AD-60874.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscusuAfsL9 6	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,003
5098	5099	871 - 893	AD-60591.2	CfsasCfaAfaCfaCfUfCfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL9 6 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL9	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,014
5100	5101	871 - 893	AD-60878.1	6 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL9	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,008
5102	5103	871 - 893	AD-60882.1	6 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL9	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,003
5104	5105	871 - 893	AD-60853.1	6 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scUfsuAf	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,007
5106	5107	871 - 893	AD-60858.1	sL96  CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scusuAfs	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,013
5108	5109	871 - 893	AD-60863.1	L96 CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,002
5110	5111	871 - 893	AD-60592.2	96 CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,013
5112	5113	871 - 893	AD-60867.1	96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0,084

5114	5115	871 - 893	AD-60871.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,008
5116	5117	871 - 893	AD-60875.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,004
5118	5119	871 - 893	AD-60879.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuA fsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,001
5120	5121	871 - 893	AD-60883.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscusuAf sL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,004
5122	5123	871 - 893	AD-60854.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,002
5124	5125	871 - 893	AD-60859.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)Ufscusu AfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0,002

Как показано в табл. выше, несколько дуплексов характеризовались эффективностью в подавлении mRNA ALAS1. Следующие дуплексы характеризовались IC50 менее чем 0,01 нМ: AD-60879, AD-60859, AD-60863, AD-60854, AD-60882, AD-60874, AD-60883, AD-60875, AD-60501, AD-60593, AD-60853, AD-60877, AD-60878, AD-60871, и AD-60873. Следующие дуплексы характеризовались IC50 менее чем 0,02 нМ: AD-60879, AD-60859, AD-60863, AD-60854, AD-60882, AD-60874, AD-60883, AD-60875, AD-60501, AD-60593, AD-60853, AD-60877, AD-60878, AD-60871, AD-60873, AD-60489, AD-60592, AD-60894, AD-60489, AD-60870, AD-60862, AD-60858, AD-60592, AD-60591, AD-60872, AD-60866, AD-60905, AD-60879, AD-60859, AD-60861. Следующие дуплексы характеризовались IC50 менее чем 0,05 нМ: AD-60879, AD-60859, AD-60863, AD-60854, AD-60882, AD-60874, AD-60883, AD-60875, AD-60501, AD-60593, AD-60853, AD-60867, AD-60878, AD-60871, AD-60873, AD-60889, AD-60894, AD-60894, AD-60889, AD-60853, AD-60862, AD-60858, AD-60871, AD-60873, AD-60889, AD-60892, AD-60894, AD-608870, AD-60862, AD-60858, AD-608591, AD-60872, AD-60866, AD-60905, AD-60857, AD-60813, AD-60861, AD-60853.2, AD-60902.1, AD-60881.1, AD-60519.2, AD-60507.2, AD-60591.3, AD-60851.1, AD-60896.1 и AD-60537.2.

Пример 29. In vivo исследования связи структура-активность AD-60489

Получали производные исходной siRNA AD-60489 и подвергали скринингу in vivo на крысах.

### In vivo скрининг 1 производных AD-60489

Последовательности siRNA, которые подвергали скринингу, представлены в табл. ниже. Таблица 36. Последовательности дуплексов siRNA ALAS1

		Целевые сайты		•	
SEQ ID NO: (смысло вая)	SEQ ID NO: (анти- смыслова я)	антисмысловой последовательнос ти NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
5126	5127	871 - 893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu CfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfc UfuUfcUfgsgsu
5128	5129	871 - 893	AD-60501.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfu CfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5130	5131	871 - 893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5132	5133	871 - 893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcUfgsgsu
5134	5135	871 - 893	AD-60495.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfu CfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcUfuUfcUfgsgsu
5136	5137	871 - 893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfu CfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfc AfcdTcuudTcugsgsu
5138	5139	871 - 893	AD-60935.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu CfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcUfgsgsu
5140	5141	871 - 893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
		2 / 'T	NT A TT		'DATA

Крысам вводили разовую дозу 3 мг/кг siRNA. Через 5 дней после введения siRNA, проводили измерения уровней mRNA, mRNA ALAS1 крыс (rALAS1) и mRNA GAPDH крыс (rGAPDH), при помощи анализа с bDNA, и уровни лекарственного средства в ткани (siRNA) определяли при помощи qPCR.

Как показано на фиг. 40 (вверху), siRNA AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900 и AD-60935 характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с AD-60489. siR-NA AD-60519, AD-60901, AD-60495 и AD-60935 обеспечивали более высокие уровни в печени, чем AD-60489 (см. фиг. 40, внизу). Таким образом, большинство из дуплексов, которые обеспечивали повышенное подавление mRNA ALAS1, также достигали более высоких уровней в печени.

По меньшей мере для дуплексов AD-60489, AD-60519 и AD-60901 эффективность коррелировала с уровнями siRNA в печени (см. фиг. 41), так что более высокий уровень siRNA в печени был связан с более высоким подавлением mRNA ALAS1.

### In vivo скрининг 2 производных AD-60489

Последовательности siRNA, которые подвергали скринингу, представлены в табл. ниже.

Таблица 37. Последовательности дуплексов siRNA ALAS1

		Целевые сайты			
SEQ ID NO: (смысл овая)	SEQ ID NO: (анти- смыслова я)	антисмысловой последовательнос ти NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
5142	5143	871 - 893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu CfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfu UfcUfgsgsu
5144	5145	871 - 893	AD-60879	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfu Cf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTu UfcUfgsgsu
5146	5147	871 - 893	AD-61190	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfu CfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfc UfuUfcUfgsgsu
5148	5149	871 - 893	AD-61191	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfu CfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfc UfuUfcUfgsgsu
5150	5151	871 - 893	AD-60877	csasgaaaGfAfGfugucuca (Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
5152	5153	871 - 893	AD-61192	csasgaaaGfAfGfugucuca (Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
5154	5155	871 - 893	AD-60865	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
5156	5157	871 - 893	AD-60861	csasgaaaGfAfGfugucuca (Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfc UfuUfcUfgsgsu
5158	5159	871 - 893	AD-60876	csasgaaaGfaGfuGfuCfu CfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcd TcuudTcugsgsu
5160	5161	871 - 893	AD-61193	csasgaaaGfaGfuGfu CfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcac UfcdTuUfcUfgsgsu
5162	5163	871 - 893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfu CfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfc UfcUfuUfcUfgsgsu

Крысам вводили разовую дозу 2,5 мг/кг siRNA. Через 5 дней после введения siRNA измерения уровней mRNA, mRNA ALAS1 крыс (rALAS1) и mRNA GAPDH крыс (rGAPDH), выполняли при помощи анализа с bDNA.

Как показано на фиг. 42, siRNA AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193 и AD-60519 характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с AD-60489.

Пример 30. Введение нескольких доз повышает эффективность

Для исследования эффектов введения нескольких доз siRNA крысам (n=3 на группу) вводили PBS или siRNA (AD-58632, AD-60925, AD-60419, AD-60445, AD-60892, AD-60489, AD-60519 или AD-60901) в дозе 2,5 мг/кг два раза в неделю в течение 2 недель. Уровни mRNA ALAS1 крыс (rALAS1) и mRNA GAPDH крыс (rGAPDH) оценивали при помощи анализа с bDNA.

Таблица 38. Последовательности дуплексов siRNA ALAS1

SEQ ID	SEQ ID NO:	Целевые сайты	Название	Смысловая	Антисмысловая
NO: (смыслов ая)	(анти- смысловая)	антисмысловой последовательности NM_000688.4	дуплекса	последовательность (5'-3')	последовательность (5'-3')
5164	5165	873 - 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacA fcUfcUfuUfcsusg
5166	5167	873 - 895	AD-60925	GfsasAfaGfAfGfuGfucuca uc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAf cAfcUfcUfuUfcsusg
5168	5169	873 - 895	AD-60419	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcu caucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg
5170	5171	873 - 895	AD-60445	GfsasAfaGfAfGfuGfucuca uc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg
5172	5173	873 - 895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfucauc uucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfc Afcucuuucsusg
5174	5175	871 - 893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu CfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacU fcUfuUfcUfgsgsu
5176	5177	871 - 893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCf aucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAf cUfcUfuUfcUfgsgsu
5178	5179	871 - 893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCf aucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacU fcUfuUfcUfgsgsu

Как показано на фиг. 43, производные siRNA AD-58632, AD-60892, AD-60419, AD-60445 и AD-60925 характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с исходным AD-58632. Кроме того, производные siRNA AD-60489, AD-60519 и AD-60901 характеризовались повышенным подавлением mRNA ALAS1 по сравнению с исходным AD-60489.

Пример 31. Исследования введения нескольких доз AD-60519 и AD-60489

Терапевтическую эффективность AD-60519 исследовали на крысиной модели AIP. Схема эксперимента показана на фиг. 44 (вверху). Крыс обрабатывали PBS или siRNA ALAS1-GalNAc либо в количестве 2,5 мг/кг, либо в количестве 5 мг/кг два раза в неделю в течение трех недель. Фенобарбитал (фенобарб) и siRNA PBGD в составе LNP с AF11 вводили в периоды времени, указанные на фиг. 44. Контрольная группа получала только PBS и siRNA PBGD, без индукции фенобарбиталом. Мочу собирали на 18-19 дни исследования.

Результаты показаны на фиг. 44 (внизу). Введение фенобарбитала и PBS индуцировало экспрессию mRNA ALAS1 и повышало уровни PBG и ALA в моче (см. фиг. 44) по сравнению только с PBS. Обработка суммарно 2,5 или 5 мг/кг из шести доз AD-60519 два раза в неделю подавляла индуцированные фенобарбиталом повышения уровней PBG в моче и ALA в моче (фиг. 44). Эти результаты показывают, что AD-60519 является эффективным в подавлении уровней ALA и PBG при введении повторных доз до 2,5 мг/кг. В частности, AD-60519 был эффективным в снижении повышений уровней PBG и ALA в моче, связанных с острыми приступами в крысиной модели AIP.

В дополнительных исследованиях с использованием такой же схемы эксперимента, но в мышиной модели (см. схему вверху фиг. 44) исследовали терапевтическую эффективность AD-60519 и AD-60489 в подавлении индуцированных фенобарбиталом повышений уровней PBG и ALA в сыворотке. В контрольной группе PBS ("физиологического раствора") введение фенобарбитала повышало уровни PBG и ALA в сыворотке (см. фиг. 45) по сравнению только с PBS. Обработка суммарно шестью дозами в 2,5 или 5 мг/кг AD-60519 или AD-60489 два раза в неделю подавляла индуцированные фенобарбиталом повышения уровней PBG в сыворотке и ALA в сыворотке (фиг. 44). Эти результаты показывают, что как AD-60519, так и AD-60489, являются эффективным в подавлении уровней ALA и PBG при введении повторных доз до 2,5 мг/кг. В частности, AD-60519 и AD-60489 были эффективными в снижении повышений уровней PBG и ALA в сыворотке, связанных с острыми приступами.

Поскольку лекарственные препараты в этом примере вводили до индукции фенобарбиталом, эти результаты указывают, что AD-60519 и AD-60489 оказывают профилактические эффекты.

Пример 32. Дополнительные последовательности siRNA

Получали следующие последовательности производных siRNA AD-58632 (табл. 39) и AD-60489 (табл. 40).

SEQ ID NO SEQ ID NO Целевые сайть NM 000688 5181 5180 GfsasAfaGfAfGfuGfu asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfc 873 - 895 AD-60802 ucauc(Tgn)ucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucauc(Tgn)ucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfuc ucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgacAfcu 5182 5183 asAfsgAfaGiaug culucsusg asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAf cUfcUfuUfcsusg asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfr 873 - 895 AD-60824 5184 5185 873 - 895 ucauc(Tgn)ucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfd1 5186 5187 873 - 895 AD-60843 cucaucuucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfdT ucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgacAfcu 5188 5189 873 - 895 AD-60847 cuuucsusg asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAf cUfcUfuUfcsusg asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfc cucaucuucuuL96 GfsasAfaGfAfGfuGfd1 5190 5191 873 - 895 cucaucuucuuL96 GfsasAfaGfaGfuGfuCf 5192 5193 873 - 895 AD-60819 uCfaucuuCfuuL96 GfsasAfaGfaGfuGfuCf ucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgacAfcu 5194 5195 873 - 895 cuuucsusg asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAf cUfcUfuUfcsusg AD-60823 uCfaucuuCfuuL96 GfsasAfaGfaGfuGfuCf 5196 5197 873 - 895 iCfaucuuCfuuL96 SfsasAfaGfaGfuGfdT 5198 5199 873 - 895 asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfc ucuuucsusg CfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf L96 GfsasAfaGfaGfuGfdT 5201 5200 873 - 895 asAfsgAfaGfaugAfgacAfcu CfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf L96 GfsasAfaGfaGfuGfdT 5202 5203 873 - 895 asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAf cUfcUfuUfcsusg CfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf gsasaagaGfuGfuCfuc 5204 5205 asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfc 873 - 895 gsasaagaGtuGfuCfuc aucuucuuL96 gsasaagaGfuGfuCfuc aucuucuuL96 gsasaagaGfuGfuCfuc aucuucuuL96 gsasaagaGfuGfdTCfu ucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgacAfcu 5206 5207 873 - 895 AD-60839 cuuucsusg asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAf cUfcUfuUfcsusg asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfc 5208 5200 873 - 895 5210 521 873 - 895 caucuucuuL96 caasaaaaGfuGfdTCfu ucuuucsusg asAfsgAfaGfaugAfgacAfcu 5212 5213 873 - 895 caucuucuuL96 gsasaagaGfuGfdTCfu cuuucsusg asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAf 5214 5215 873 - 895

Таблица 39. Производные последовательности AD-58632

Таблица 40. Производные последовательности AD-60489

caucuucuuL96

SEQ ID NO: (смысловая)	SEQ ID NO: (анти- смысловая)	Целевые сайты антисмысловой последовательности NM_000688.4	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')
5216	5217	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdT GfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfadTgAfgAfcA fcdTcuudTcugsgsu

5218	5219	871 - 893	AD-60879	CfsasGfaAfaGfaGfdT GfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfca cUfcdTuUfcUfgsgsu
5220	5221	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdT GfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5222	5223	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfdT GfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfca cUfcUfuUfcUfgsgsu
5224	5225	871 - 893	AD-60877	csasgaaaGfAfGfugucu ca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcA fcdTcuudTcugsgsu
5226	5227	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucu ca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfca cUfcdTuUfcUfgsgsu
5228	5229	871 - 893	AD-60865	csasgaaaGfAfGfugucu ca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5230	5231	871 - 893	AD-60861	csasgaaaGfAfGfugucu ca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfca cUfcUfuUfcUfgsgsu
5232	5233	871 - 893	AD-60876	csasgaaaGfaGfuGfuCf uCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcA fcdTcuudTcugsgsu
5234	5235	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCf uCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfca cUfcdTuUfcUfgsgsu
5236	5237	871 - 893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfuCf uCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfc AfcUfcUfuUfcUfgsgsu

Пример 33. Дополнительные исследования введения нескольких доз AD-60519

Терапевтическую эффективность AD-60519 исследовали в крысиной модели AIP, подобной той, которую использовали в примере 31. Схема эксперимента показана на фиг. 46 (вверху). Крыс обрабатывали PBS или siRNA ALAS1-GalNAc в количестве 3, 1 или 0,3 мг/кг раз в неделю в течение четырех недель (обработка на 0, 7, 14 и 21 день). Фенобарбитал (фенобарб) и siRNA PBGD в составе LNP с AF11 вводили в периоды времени, указанные на фиг. 46. Контрольная группа получала только PBS и siRNA PBGD без индукции фенобарбиталом. Мочу собирали на 25 день исследования.

Результаты показаны на фиг. 46 (внизу) и на фиг. 47. Введение фенобарбитала и PBS индуцировало экспрессию mRNA ALAS1 и повышало уровни PBG и ALA в моче по сравнению только с PBS. Обработка суммарно четырьмя дозами в 3, 1 или 0,3 мг/кг АD-60519 раз в неделю подавляла индуцированные фенобарбиталом повышения уровней mRNA ALAS1 крыс в печени дозозависимым образом (см. фиг. 46). (Уровни mRNA ALAS1 (rALAS1) крыс в печени выражали относительно уровней mRNA GAPDH крыс). Уровни PBG в моче и ALA в моче также характеризовались дозозависимыми эффектами.

Повторные дозы AD-60519 раз в неделю были эффективными в подавлении экспрессии mRNA ALAS1 и в снижении повышенных уровней ALA и PBG, связанных с индуцированными острыми приступами в крысиной модели АІР. Эти эффекты лечения были дозозависимыми. Данные результаты показывают, что AD-60519 может действовать профилактически при введении доз до приступа.

Пример 34. Эффекты введения нескольких доз конъюгатов GalNAc c siRNA ALAS1 у отличных от человека приматов

Эффекты конъюгатов GalNAc с siRNA ALAS1 в подавлении mRNA ALAS1 в печени и mRNA ALAS1 в крови исследовали в исследовании на отличных от человека приматах (NHP). Использовали конъюгаты GalNAc AD-58632, AD-60519, AD-61193 и AD-60819. Схема исследования показана в табл. 41 и на фиг. 48.

N Уровень Конц. Частота Дни Исследуемый № Объем

Таблица 41. Схема исследования NHP

			p possesses				00000	1 3
объект	группы		дозы	дозы	введения дозы	введения	дозы	введения
			(мг/кг)	(мг/мл)		дозы	(мл/кг)	дозы
AD-58632	1	3	2,5	1,25	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; два раза в неделю, 2-4 недели	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18,		
AD-60519	2	3	1,25	0,625	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; два раза в неделю, 2-4 недели	22, 25	2	SC
	3	3	2,5	1,25	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; два раза в неделю, 2-4 педели			
	4	3	2,5	1,25	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; раз в неделю, 2-4 недели	1, 2, 3, 4, 5, 11, 18, 25		
	5	3	5	2,5	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; раз в неделю, 2-4 недели			
AD-61193	6	3	2,5	1,25	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; два раза в неделю, 2-4 недели	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 25		
AD-60819	7	3	2,5	1,25	Раз в день, 5 дней, 1 неделя; два раза в неделю, 2-4	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 25		
					недели			

Каждая группа получала несколько подкожных доз конъюгата GalNAc с ALAS1 siRNA в объеме дозы 2 мг/мл. Группа 1 (n=3) получала 2,5 мг/кг с 1,25 мг/мл AD-58632 на 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 и 25 дни. Группа 2 (n=3) получала 1,25 мг/кг с 0,625 мг/мл AD-60519 на 1,2, 3,4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 и 25 дни. Группа 3 (n=3) получала 2,5 мг/кг с 1,25 мг/мл AD-60519 на 1,2, 3,4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 и 25 дни. Группа 4 (n=3) получала 2,5 мг/кг с 1,25 мг/мл AD-60519 на 1, 2, 3, 4, 5, 11, 18 и 25 дни. Группа 5 (n=3) получала 5 мг/кг с 2,5 мг/мл AD-60519 на 1, 2, 3, 4, 5, 11, 18 и 25 дни. Группа 6 (n=3) получала 2,5 мг/кг с 1,25 мг/мл AD-61193 на 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 и 25 дни. Группа 7 (n=3) получала 2,5 мг/кг с 1,25 мг/мл AD-60819 на 1,2,3,4,5,8,11,15,18,22 и 25 дни.

Образцы сыворотки для анализа определения циркулирующей внеклеточной РНК (cERD) (см. пример 21) собирали на - 3, 7, 13, 21, 27, 39, 46 и 60 дни (на фиг. 48, "PD заборы" указывает дни, в которые собирали сыворотку). Сыворотки собирали для биохимического анализа крови на - 3 и 6 дни. Биохимический анализ включал оценку уровней аланинтрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP). Сайленсинг mRNA ALAS1 оценивали в ткани печени, полученной в результате биопсии печени на 21 день (см. фиг. 48). Биопсию выполняли после забора сыворотки.

### Подавление уровней mRNA ALAS1 в печени

Уровни mRNA ALAS1 в печени на 21 день исследования показаны на фиг. 49. Результаты показаны в виде процента от среднего уровня, наблюдаемого в контрольной группе, обработанной PBS. Результаты показаны в виде средних величин для каждой группы обработки.

Эти результаты, представленные на фиг. 49 показывают, что по сравнению с контрольными животными, которые получали обработку РВЅ, все из условий обработки были эффективными в подавлении уровней mRNA ALAS1 в печени. Обработки обеспечивали сайленсинг mRNA, находящийся в диапазоне приблизительно от 20 до 80% (соответствующий уровням mRNA ALAS1, находящимся в диапазоне приблизительно от 80 до 20% от контрольных уровней). Отдельные животные, которые получали AD-58632, характеризовались сайленсингом приблизительно 20-50%, при этом средний уровень сайленсинга составлял приблизительно 40% (уровни mRNA ALAS1 составляли в среднем приблизительно 60% от контрольных уровней). При всех используемых схемах введения доз АD-60519 был высокоэффективным в подавлении уровней mRNA ALAS1. Отдельные животные, которые получали AD-60519, характеризовались сайленсингом приблизительно 60-80% (уровни mRNA ALAS1 составляли приблизительно 20-40% от контрольных уровней). В среднем, режимы обработки АD-60519 обеспечивали сайленсинг приблизительно 65-75%. Как раскрыто в данном документе, АD-60519 является производным AD-60489. Подобные результаты для АD-60489 раскрыты в примере 20 и показаны на фиг. 30. Кроме того, AD-61193 (производное AD-60489) и AD-60819 (производное AD-58632) также обеспечивали сайленсинг на более чем 50%. Заслуживает внимания, что уровни сайленсинга, описанные в этом примере и в примере 20 (например, приблизительно 20-80%), достигались даже в "неиндуцированном" состоянии; ожидается, что в индуцированном состоянии, например, когда уровни ALAS1 остро или хронически повышены (например, у пациента, имеющего порфирию или с риском развития порфирии, например, острой печеночной порфирии, например, AIP), более низкие уровни сайленсинга, например, снижение уровней mRNA ALAS1 до нормальных уровней или уровней до приступа, могут быть достаточными для достижения терапевтической эффективности.

## Подавление уровней циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1

На фиг. 50 показаны уровни циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 (средние величины и стандартные отклонения) в каждой временной точке в течение исследования, когда получали образцы сыворотки. Результаты по циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 показывают эффективность сайленсинга mRNA после обработки несколькими дозами каждой из изученных siRNA (AD60519, AD-61193, AD-60819 и AD-58632). Во всех группах наибольший эффект подавления на циркулирующую mRNA ALAS1 наблюдали на 27 день, после конечной дозы siRNA на 25 день. Во всех группах обработки в течение нескольких недель после прекращения обработки уровни mRNA ALAS1 постепенно повышались и возвращались к исходному уровню при конечном измерении на 60 день.

Наиболее выраженное подавление циркулирующей mRNA ALAS1 (максимальный сайленсинг около 80%) наблюдали в группе 3 (2,5 мг/кг AD-60519, раз в день, 5 дней, два раза в неделю, 3 недели) и группе 5 (5 мг/кг AD-60519, раз в день, 5 дней, раз в неделю, 3 недели). Группа 2 (1,25 мг/кг AD-60519, раз в день, 5 дней, два раза в неделю, 3 недели), группа 4 (2,5 мг/кг AD-60519, раз в день, 5 дней, раз в неделю, 3 недели), группа 7 (2,5 мг/кг AD-60819, раз в день, 5 дней, два раза в неделю, 3 недели) и группа 6 (2,5 мг/кг AD-61193, раз в день, 5 дней, раз в неделю, 3 недели) также характеризовались отличным подавлением, при максимальном сайленсинге (27 день) более чем 50%. В группе 1 также был достигнут заметный сайленсинг (более чем 30% на 27 день).

Эти результаты согласуются с результатами по mRNA ALAS1 в печени и подтверждают высокую активность AD-60519. При уровнях доз до 1,25 мг/кг AD-60519 обеспечивал 65-75% сайленсинг.

### Корреляция между уровнями циркулирующей mRNA ALAS1 и печени

На фиг. 27 показаны уровни mRNA ALAS1 в печени (левые столбцы) и в сыворотке (правые столбцы). Имеется высокая корреляция между относительными уровнями mRNA ALAS1, измеренными в печени и в сыворотке, указывая на то, что эти измерения представляют надежные результаты.

Пример 35. Исследование введения разовой дозы AD-60519 и AD-60589 крысам при помощи анализа сERD мочи для отслеживания длительности подавления mRNA ALAS1

Исследование введения разовой дозы проводили у крыс с использованием коньюгатов GalNAc с siRNA ALAS1 AD-60489 и AD-60519. Эффективность этих коньюгатов GalNAc в ингибировании экспрессии mRNA ALAS1 отслеживали на основании оценок мочи при помощи анализа определения циркулирующей внеклеточной PHK. Анализ был подобным анализу, используемому в примерах 21 и 34, за исключением того, что использовали образцы мочи. Образцы мочи лиофилизировали для ее концентрирования. Лиофилизированную мочу ресуспендировали в 4 мл  $dH_2O$  и перемешивали на вортексе. Затем образец центрифугировали при 4000xg в течение 10-20 мин для осаждения любых клеточных остатков. Оставшиеся стадии были подобны таковым, описанным в примере 21.

Группам крыс вводили разовую дозу 10 мг/кг AD-60489 или AD-60519. Нормализованные уровни mRNA ALAS1 в различные временные точки в течение исследования показаны на фиг. 51. Временная точка, указанная как "0 часов" представлена для исходного, до введения дозы, образца мочи, отобранного непосредственно перед введением mRNA ALAS1. Результаты для следующих временных точке выражены в виде доли от уровня до введения дозы.

Как можно увидеть исходя из результатов, показанных на фиг. 51, AD-60519 представлял повышенную эффективность по сравнению с AD-60489. При этой максимальной величине разовая доза AD-60519 обеспечивала подавление до приблизительно 80%, при этом подавление, предоставленное AD-60489, составляло приблизительно 60%. Эффект разовой дозы 10 мг/кг этих siRNA ALAS1 в подавлении mRNA ALAS1 длился приблизительно 21 день. Эти результаты показывают валидность анализа сERD мочи для отслеживания уровней mRNA ALAS1.

Пример 36. Фармакологические эффекты AD-60519 у отличных от человека приматов

Дополнительное исследование эффектов конъюгата GalNAc AD-60519 с siRNA ALAS1 проводили у отличных от человека приматов. В исследовании изучали эффект введения доз раз в неделю по сравнению с ведением доз два раза в неделю, использования нагрузочной дозы по сравнению с использованием не нагрузочной дозы, а также кинетику сайленсинга mRNA ALAS1 после разовой дозы. Схема исследования показана в табл. 42 и на фиг. 52.

Таблица 42. Схема фармакологического исследования для исследования с применением AD-60519

№ группы	N	Уровень дозы (мг/кг)	Частота введения дозы	Потреб ность в вещест ве (мг)*	Объем дозы (мл/кг)	Дни введен ия дозы	Конц. дозы (мг/мл)	Путь введен ия дозы
1	3	2,5	Раз в неделю, 8 недель	210	0,125	1, 8, 15, 22, 29,		
2	3	5	Раз в неделю, 8 недель	420	0,25	36, 43, 50		
3	3	Нагрузка - раз в день, 3 дня, 5 мг/кг,	Нагрузка, 1-3 дни, раз в неделю,	525	0,25/25	1, 2, 3, 8, 15, 22, 29,		
		поддерж 5 мг/кг	7 недель			36, 43, 50	20	SC
4	3	Нагрузка - Раз в день, 3 дня, 5 мг/кг, поддерж 2,5 мг/кг	Нагрузка, 1-3 дни, раз в неделю, 7 недель	270	0,25/0,125			
5	3	5	Раз в две недели, 8 недель	924	0,25	1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50, 53		
6	3	1	Разовая доза	12	0,05	1		
7	3	10	Разовая доза	116	0,5	1		

Каждая группа получала одну или несколько подкожных доз AD-60519, как представлено в табл. 42. Группа 1 (n=3) получала 2,5 мг/кг в объеме дозы 0,125 мл/кг раз в неделю в течение 8 недель (дозы вводили на 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50 дни). Группа 2 (n=3) получала 5 мг/кг в объеме дозы 0,25 мг/мл раз в неделю в течение 8 недель (дозы вводили на 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50 дни). Группа 3 (n=3) получала нагрузочную дозу 5 мг/кг в объеме дозы 0,25 мл/кг раз в день в течение трех дней с последующим поддержанием дозы 5 мг/кг в объеме дозы 0,25 мл/кг раз в неделю в течение 7 недель (дозы вводили на 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50 дни). Группа 4 (n=3) получала нагрузочную дозу 5 мг/кг в объеме дозы 0,25 мл/кг раз в день в течение трех дней с последующим поддержанием дозы 2,5 мг/кг в объеме дозы 0,125 мл/кг раз в неделю в течение 7 недель (дозы вводили на 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50 дни). Группа 5 (n=3) получала 5 мг/кг в объеме дозы 0,25 мг/мл два раза в неделю в течение 8 недель (дозы вводили на 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50 и 53 дни). Группа 6 (n=3) получала разовую дозу 1 мг/кг в объеме дозы 0,5 мл/кг на 1 день. Группа 7 (n=3) получала разовую дозу 10 мг/кг в объеме дозы 0,5

мл/кг на 1 день.

Образцы сыворотки (приведенные в виде "РD заборов" на фиг. 52), образцы плазмы (приведенные в виде "РК заборов" на фиг. 52) и образцы мочи собирали, как указано на фиг. 52 и в табл. 43. Образцы мочи и сыворотки подлежали анализу cERD. Все образцы крови и мочи, собранные в день биопсии печени, собирали до биопсии печени.

Таблица 43. График забора образцов

Сыворотка для определения mRNA		Биопсия печени		Моча для определения mRNA <sup>**</sup>		Плазма для РК	
Группы 1-4	-3 день и 5, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 57, 64, 78, 92 дни	Группы 1-5	24 день*	Группы 1-5	-3 день и 24*, 52		-3 день и 1 день,
Группа 5	-3 день и 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 60, 67, 81, 95 дни	Группы 6-7	4 день*		дни	Группа 7	через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 часов и 2, 3, 4, 5, 6, 8,
Группы 6-7	-3 день и 2, 4, 6, 9, 15, 22, 29, 36 дни	, ,	Aciib	Группы 6-7	-3 день и 4*, 36 дни		9, 15, 22, 29, 36 дни

\*\*Забор первой утренней мочи

Результаты по mRNA ALAS1 в печени показаны на фиг. 53. Значимого подавления mRNA ALAS1 достигали во всех условиях введения. До 75-80% сайленсинга ALAS1 достигали при схемах введения нескольких доз с использованием АD-60519. Через три дня после разовой дозы достигали сайленсинг приблизительно 15% при использовании разовой дозы 1 мг/кг и достигали сайленсинг приблизительно 70% при использовании разовой дозы 10 мг/кг (см. фиг. 53). Сравнение данных из групп 1 и 7 показывает небольшую разницу в кинетике после разовой дозы (в группе 7) по сравнению с введением нескольких доз (группа 1) при одинаковом суммарном количестве (введено 30 мг), как оценено через 3 дня после введения дозы в группе 7 и через два дня после четвертой дозы в группе 1. В частности, более сильный сайленсинг наблюдали после разовой дозы (сайленсинг приблизительно 70% в среднем в группе 7 по сравнению с сайленсингом приблизительно 45% в среднем в группе 1). См. фиг. 54. Такой же результат также наблюдали в исследованиях на крысах.

Результаты по mRNA ALAS1 в сыворотке до 22 дня показаны на фиг. 54 (вверху). Корреляция между mRNA ALAS1 в печени, mRNA ALAS1 в сыворотке и mRNA ALAS1 в плазме показаны на фиг. 55. Данные результаты показывают высокую корреляцию между уровнями mRNA ALAS1 в печени, сыворотке и моче. Результаты также представляют дополнительное доказательство, показывающее высокую активность АD-60519. Сайленсинг на 55-75% наблюдали при всех уровнях дозы во всех схемах введения нескольких доз. Введение нагрузочных доз (раз в день в течение 3 дней, как в группах 3 и 4) приводило к несколько более быстрому снижению mRNA ALAS1. Группы, которые получали дозы раз в неделю (группы 1 и 2) или два раза в неделю (группа 5) в итоге характеризовались сопоставимыми уровнями подавления mRNA ALAS1, указывая на то, что накопление в течение времени обеспечивает длительный нокдаун.

Результаты, показывающие кинетику сайленсинга mRNA ALAS1 после разовой дозы, представлены на фиг. 54 (внизу). В группе введения 1 мг/кг подавление mRNA ALAS1 приблизительно на 20% наблюдали на 6 день. В группе введения 10 мг/кг отмечали быстрое, приблизительно 70% подавление mRNA ALAS1 на 4 день, при этом восстановление до 20% от исходного уровня наблюдали на 22 день (через 21 день после введения дозы). Уровни mRNA ALAS1 в сыворотке возвращались к исходному уровню приблизительно через 2 или 4 недели после введения разовой дозы 1 или 10 мг/кг соответственно.

Полная динамика mRNA ALAS в сыворотке до 8 недели после введения AD-60519 показана на фиг. 56. Все группы достигали максимальной величины 80% подавления mRNA ALAS1 через 5-8 недель после введения дозы ALN-AS1. Группы введения трех суточных доз на 1 неделе (раз в день, 3 дня) характеризовалась более быстрым наступлением подавления mRNA ALAS1, чем таковые с введением одной дозы на первой неделе (раз в неделю, 8 недель). Все животные возвращались к исходным уровням ALAS1 приблизительно через 30-40 дней после последней дозы.

Пример 37. Получение лекарственного препарата на основе siRNA

ALN-60519 (фиг. 57) представляет собой химически синтезированный двунитевой олигонуклеотид,

связанный ковалентными связями с лигандом, содержащим три остатка N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Все нуклеотиды являются 2'-OMe- или 2'-F-модифицированными и соединены посредством 3'-5'-фосфодиэфирных связей, образуя, таким образом, сахаро-фосфатный скелет олигонуклеотида. Смысловая нить и антисмысловая нить содержат 21 и 23 нуклеотида соответственно. 3'-конец смысловой нити конъюгирован с фрагментом GalNAc с тремя разветвлениями (называемым в данном документе L96) посредством фосфодиэфирной связи. Антисмысловая нить содержит четыре фосфоротиоатных связи - две на 3'-конце и две на 5'-конце. Смысловая нить содержит две фосфоротиоатных связи на 5'-конце. 21 нуклеотид смысловой нити гибридизируется с комплементарным 21 нуклеотидом антисмысловой нити, образуя, таким образом, 21 пару нуклеотидных оснований и выступающий конец из двух оснований на 3'-конце антисмысловой нити. Две одиночные нити, смысловую нить и антисмысловую нить, синтезировали при помощи стандартного твердо-фазного синтеза олигонуклеотидов, используя стандартную химическую структуру фосфорамидита с 5'-гидроксильной группой, защищенной в виде диметокситрифенилметилового (DMT) эфира. Каждую нить собирали от 3'- к 5'-концу последовательным добавлением защищенных нуклеозидных фосфорамидитов.

AD-60519, также обозначаемый в данном документе ALN-60519, помещали в состав в виде раствора для инъекции для подкожного применения, обозначаемый в данном документе ALN-AS1. ALN-60519 растворяли в воде для инъекции (WFI) и корректировали рН (целевой 7,0). Определяли концентрацию ALN-60519 и корректировали ее добавлением WFI. Раствор с конечной концентрацией приблизительно 200 мг/мл затем стерилизовали посредством фильтрации и наполняли в 2 мл стеклянные ампулы типа I. Выбирали объем наполнения примерно 0,55 мл для обеспечения полного изъятия 0,5 мл лекарственного препарата.

Пример 38. Измерение уровней mRNA ALAS1 в сыворотке или моче пациентов с AIP или здоровых добровольцев при помощи способа cERD

Исследования фармакологии на отличных от человека приматах с использованием ALN-AS1 указывало на то, что способ определения циркулирующей внеклеточной РНК (cERD) для измерения mRNA ALAS1 в сыворотке или моче был надежным и воспроизводимым. Анализ cERD также использовали для измерения уровней mRNA ALAS1 в сыворотке и моче от пациентов с AIP и здоровых добровольцев. Уровни mRNA ALAS1, как правило, были повышенными у пациентов с AIP относительно здоровых добровольцев, что согласуется с ролью индукции ALAS1, которую она играет в патофизиологии заболевания (фиг. 58). Важно, что уровни ALAS1 в сыворотке и моче у одного и того же пациента коррелировали друг с другом. У двух пациентов, которые имели повторные заборы мочи и сыворотки, уровень mRNA ALAS1 был стабильным в течение времени. Образно говоря, эти данные указывают на то, что mRNA ALAS1 можно измерять в образцах сыворотки и мочи от субъектов, в том числе пациентов с AIP, а способ сERD является применимым для отслеживания фармакодинамической активности ALN-AS1.

Пример 39. Иллюстративные клинические исследования

Можно провести исследование на человеке для определения безопасности и переносимости ALN-AS1 при введении в виде разовой дозы и нескольких доз пациентам с AIP, которые являются бессимптомными выраженными экскреторам (ASHE) (пациентам, которые имеют повышенные уровни ALA и/или PBG, как описано в данном документе) или пациентам с AIP, которые имеют рецидивирующие приступы.

Вторичные цели включают характеристику РК в плазме и моче для ALN-AS1, а также оценку влияния ALN-AS1 после введения дозы на уровни ALA и PBG как в плазме, так и в моче. Анализ сERD, при помощи которого измеряют mRNA в экзосомах, использовали для измерения 5-аминолевулинатсинтазы (mRNA ALAS-1) в сыворотке (или плазме) и моче.

Бессимптомным выраженным экскреторам ALN-AS1 вводят в разовых дозах, например, по 0,1, 0,35 1,0 или 2,5 мг/кг, или повторных дозах раз в неделю, например, по 1 и 2,5 мг/кг, в течение нескольких недель (например, в течение 4 недель). В качестве сравнения вводят контрольный лекарственный препарат (например, плацебо). Оценивают безопасность, фармакокинетику и эффекты лекарственного средства на уровни ALA и PBG. Дозу ALN-AS1, которая снижает ALA и PBG до нормального референтного диапазона (например, дозу, которая нормализует уровни ALA и/или PBG до уровней ниже 2 верхних референтных величин) можно выбрать для последующих исследований, например, у пациентов с AIP.

У пациентов с AIP частоту приступов и исходные симптомы оценивают во время вводного периода без введения доз (например, в 12 недель). Пациентам вводили ALN-AS1, например, в дозе 1-2,5 мг/кг раз в неделю. Оценивали безопасность, фармакокинетику и эффекты лекарственного средства на уровни ALA и PBG. Кроме того, отслеживали изменения числа приступов, применения гема, применения обезболивающего средства и госпитализации.

#### Эквиваленты

Специалисты в данной области распознают или будут способны определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, многие эквиваленты к конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены следующей формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

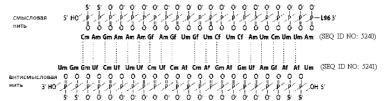
- 1. Двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии синтазы 5'-аминолевулиновой кислоты печени 1 (ALAS1), где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, которая включает участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1 (например, SEQ ID NO:1) и содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов последовательности UAAGAU-GAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) или UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154).
- 2. Двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, которая включает участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1 (например, SEQ ID NO:1) и содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов из (i) антисмысловой последовательности, приведенной в любой из табл. 21-40, или (ii) немодифицированного варианта антисмысловой последовательности, приведенной в любой из табл. 21-40 (SEQ ID NO: 4172-5237).
- 3. DsRNA по п.2, где упомянутая dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотил.
- 4. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где дуплексный участок составляет 17-23 пары нуклеотидов в длину.
- 5. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере одна нить содержит 3'выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.
- 6. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где каждая нить составляет не более 26 нуклеотидов в длину.
- 7. DsRNA по п.3, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид выбран из 2'-О-метила, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида и необязательно одной или нескольких 5'-фосфотиоатных групп или любой их комбинации.
- 8. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая лиганд, при этом лиганд конъюгирован либо с 3'-концом, либо с 5'-концом смысловой нити dsRNA.
- 9. DsRNA по п.8, где лиганд содержит углевод, при этом лиганд необязательно представляет собой лиганд GalNAc.
  - 10. DsRNA по п.9, где лиганд представляет собой

- 11. DsRNA по любому из пп.8-10, где лиганд присоединен с помощью двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.
  - 12. DsRNA по п.11, где лиганд и линкер показаны в формуле XXIV

13. DsRNA по п.8, где dsRNA конъюгирована с лигандом L96 с помощью линкера, как показано ниже

- 14. DsRNA по любому из пп.8-13, где лиганд нацеливает dsRNA в гепатоциты.
- 15. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где dsRNA содержит смысловую нить, состоящую из последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в табл. 21-40, и антисмысловой нити, состоящей из последовательности, выбранной из последовательностей, приведенных в табл. 21-40.

- 16. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где dsRNA характеризуется значением  $IC_{50}$ , составляющим менее 1 нM, менее 0,05 нM, менее 0,02 нM или менее 0,01 нM.
- 17. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где dsRNA характеризуется разовой дозой ED50, составляющей менее приблизительно 10 мг/кг или менее приблизительно 5 мг/кг.
- 18. DsRNA по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит последовательность CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155) или состоит из нее.
  - 19. DsRNA no п.1 или 2, где:
- (i) антисмысловая нить содержит антисмысловую последовательность AD-60519, где антисмысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60519;
- (ii) антисмысловая нить состоит из антисмысловой последовательности AD-60519, где антисмысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60519;
- (iii) смысловая нить содержит смысловую последовательность AD-60519, где смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60519;
- (iv) смысловая нить состоит из смысловой последовательности AD-60519, где смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60519;
- (v) смысловая нить содержит смысловую последовательность AD-60519, а антисмысловая нить содержит антисмысловую последовательность AD-60519, где смысловая и антисмысловая последовательности содержат все модифицированные нуклеотиды из AD-60519, или
- (vi) смысловая нить состоит из смысловой последовательности AD-60519, а антисмысловая нить состоит из антисмысловой последовательности AD-60519, где смысловая и антисмысловая последовательности содержат все модифицированные нуклеотиды из AD-60519.
  - 20. DsRNA по п.1 или 2, где:
- (i) антисмысловая нить содержит антисмысловую последовательность AD-60489 и/или смысловая нить содержит смысловую последовательность AD-60489, где антисмысловая и/или смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60489, или
- (ii) антисмысловая нить состоит из антисмысловой последовательности AD-60489 и/или смысловая нить состоит из смысловой последовательности AD-60489, где антисмысловая и/или смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60489.
  - 21. DsRNA по п.1 или 2, где:
- (i) антисмысловая нить содержит антисмысловую последовательность AD-61193 и/или смысловая нить содержит смысловую последовательность AD-61193, где антисмысловая и/или смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-61193, или
- (ii) антисмысловая нить состоит из антисмысловой последовательности AD-61193 и/или смысловая нить состоит из смысловой последовательности AD-61193, где антисмысловая и/или смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-61193.
  - 22. DsRNA по п.2, где:
- (i) антисмысловая нить содержит антисмысловую последовательность AD-60819 и/или смысловая нить содержит смысловую последовательность AD-60819, где антисмысловая и/или смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60819, или
- (ii) антисмысловая нить состоит из антисмысловой последовательности AD-60819 и/или смысловая нить состоит из смысловой последовательности AD-60819, где антисмысловая и/или смысловая последовательность содержит все модифицированные нуклеотиды из AD-60819.
- 23. Двунитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ALAS1, где упомянутая dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем антисмысловая нить включает участок комплементарности PHK-транскрипту ALAS1, причем указанная dsRNA находится в форме конъюгата, имеющего следующую структуру:



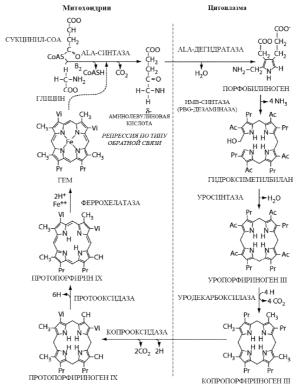
- 24. Клетка, содержащая dsRNA по любому из пп. 1-23.
- 25. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена ALAS1, при этом композиция содержит dsRNA по любому из пп.1-23.
- 26. Фармацевтическая композиция по п.25, где dsRNA вводится в безбуферном солевом или водном растворе.
- 27. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, где упомянутая композиция является пригодной для подкожного введения.
  - 28. Способ ингибирования экспрессии ALAS1 в клетке, при этом способ включает:
  - (a) введение в клетку dsRNA по любому из пп.1-22 и
- (b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для обеспечения разрушения mRNA-транскрипта гена ALAS1, с ингибированием тем самым экспрессии гена ALAS1 в клетке.

при этом экспрессия ALAS1 необязательно ингибируется по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 30%.

- 29. Способ снижения уровня порфирина или предшественника порфирина (например, ALA или PBG) в клетке (например, гепатоците), включающий приведение клетки в контакт с dsRNA по любому из пп.1-22 в количестве, эффективном для снижения уровня порфирина или предшественника порфирина в клетке.
- 30. Способ лечения порфирии, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества:
  - (i) dsRNA по любому из пп.1-22 или
  - (ii) композиции по любому из пп.25-27,
  - с осуществлением тем самым лечения порфирии.
- 31. Способ по п.30, где субъектом является субъект с риском развития порфирии или с диагностированной порфирией.
- 32. Способ по п.30 или 31, где порфирия представляет собой острую перемежающуюся порфирию или порфирию, обусловленную недостаточностью ALA-дегидратазы.
  - 33. Способ по любому из пп.30-32, где:
  - (i) dsRNA или композицию, содержащую dsRNA, вводят после острого приступа порфирии,
  - (ii) dsRNA или композицию, содержащую dsRNA, вводят во время острого приступа порфирии или
- (iii) dsRNA или композицию, содержащую dsRNA, вводят профилактически для предупреждения острого приступа порфирии.
- 34. Способ по любому из пп.30-33, где dsRNA вводят в дозе 0,05-50 мг/кг веса тела субъекта, например в дозе 0,01-5 мг/кг веса тела субъекта.
  - 35. Способ по любому из пп.30-34, где с помощью способа:
- (i) снижают уровень порфирина или предшественника порфирина (например, 5-аминолевулиновой кислоты (ALA) или порфобилиногена (PBG)) у субъекта, при этом необязательно уровень снижают по меньшей мере на 30%, и/или
  - (ii) ингибируют экспрессию ALAS1 у субъекта.
  - 36. Способ по любому из пп.30-35, где с помощью упомянутого способа:
- (i) облегчают симптом, ассоциированный с нарушением, связанным с ALAS1 (например, порфирией),
- (ii) снижают частоту острых приступов симптомов, ассоциированных с порфирией, у субъекта и/или
- (iii) снижают вероятность возникновения острых приступов симптомов, ассоциированных с порфирией, у субъекта в случае, когда субъект подвержен воздействию провоцирующего фактора, например предменструальной фазы.
- 37. Способ по любому из пп.30-36, где dsRNA или композицию, содержащую dsRNA, вводят согласно схеме дозирования, например еженедельно, один раз в две недели или ежемесячно.
- 38. Способ по любому из пп.30-37, где dsRNA вводят до острого приступа порфирии, например во время продрома.
- 39. Способ по любому из пп.30-38, где субъект имеет повышенный уровень (например, уровень в плазме или моче) ALA и/или PBG и при этом необязательно субъект испытывает хроническую боль.
- 40. Способ по любому из пп.30-39, где с помощью способа снижают повышенный уровень ALA и/или PBG.
- 41. Способ по любому из пп.30-40, где с помощью способа снижают или предупреждают боль, нейропатию и/или повреждение нервов.

- 42. Способ по любому из пп.30-41, где с помощью способа предупреждают острые приступы порфирии.
- 43. Способ по любому из пп.30-42, где dsRNA или композицию, содержащую dsRNA, вводят систематически.
- 44. Способ лечения субъекта с повышенным уровнем ALA и/или PBG, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества:
  - (i) dsRNA по любому из пп.1-22 или
  - (іі) композиции по любому из пп.26-28,
  - при этом необязательно способ является эффективным для снижения уровня ALA и/или PBG.
- 45. Способ лечения субъекта с повышенным уровнем ALA и/или PBG, при этом способ включает введение dsRNA по любому из пп.1-23 по 1, 2,5 или 5 мг/кг один раз в неделю в течение по меньшей мере десяти недель со снижением тем самым уровня ALA и/или PBG у упомянутого субъекта.
- 46. Способ лечения пациента-человека с AIP, который испытывал несколько рецидивирующих приступов, при этом способ включает введение dsRNA по любому из пп.1-22 в дозе 2,5 мг/кг в течение по меньшей мере 6 месяцев с осуществлением тем самым лечения упомянутого пациента, при этом необязательно с помощью упомянутого способа:
  - (і) снижают частоту приступов,
  - (ii) сокращают применение гематина,
  - (iii) снижают риск госпитализации и/или
  - (iv) повышают качество жизни.
- 47. Способ анализа уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта, при этом упомянутый способ включает выявление (например, измерение) уровня mRNA ALAS1 в образце биологической жидкости (например, образце крови, образце плазмы, образце сыворотки или образце мочи) от субъекта, при этом упомянутый образец биологической жидкости содержит mRNA ALAS1, с осуществлением тем самым анализа уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта.
- 48. Способ анализа уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта, при этом упомянутый способ включает:
- (i) получение РНК (например, внеклеточной РНК) из образца биологической жидкости (например, образца крови, образца плазмы, образца сыворотки или образца мочи) от субъекта, при этом упомянутый образец биологической жидкости содержит mRNA ALAS1;
  - (ii) получение cDNA ALAS1 с mRNA ALAS1;
- (iii) приведение в контакт cDNA ALAS1 с нуклеиновой кислотой, комплементарной (например, зондом и/или праймером) cDNA ALAS1 или ее части, с получением тем самым реакционной смеси, и
- (iv) выявление (например, измерение) уровня cDNA ALAS1 в реакционной смеси, где уровень cDNA ALAS1 указывает на уровень mRNA ALAS1,
- с осуществлением тем самым анализа уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта
  - 49. Способ по п.48, причем:
  - (a) способ включает PCR, qPCR или 5'-RACE,
  - (b) нуклеиновая кислота представляет собой зонд или праймер и/или
- (c) нуклеиновая кислота содержит выявляемый фрагмент, а уровень mRNA ALAS1 определяют посредством выявления количества выявляемого фрагмента.
- 50. Способ по п.49, где эффективность лечения порфирии оценивают на основании сравнения уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта с нормальным значением.
- 51. Способ по п.49, где снижение уровня циркулирующей внеклеточной mRNA ALAS1 у субъекта в ответ на лечение порфирии относительно нормального значения указывает на то, что лечение порфирии является эффективным.
- 52. Способ по любому из пп.49-51, дополнительно включающий получение образца биологической жидкости от субъекта.
- 53. Способ по п.52, в котором образец биологической жидкости является отделенным от ткани и при этом образец биологической жидкости содержит экзосомы.
  - 54. Композиция, содержащая dsRNA по п.19 и воду для инъекции.
  - 55. Композиция по п.54, содержащая приблизительно 200 мг/мл dsRNA по п.20.
  - 56. Композиция по п.54 или 55, где композиция характеризуется значением рН 6,0-7,5.
  - 57. Композиция по любому из пп.54-56, где композиция составлена для подкожной инъекции.
- 58. Способ лечения субъекта с порфирией (например, AIP) или повышенным уровнем ALA и/или PBG, при этом способ включает подкожное введение субъекту композиции по любому из пп.53-56.
- 59. Способ по п.58, где композицию вводят в дозе 0-5 мг/кг, например в дозе 2,5 мг/кг или менее или в дозе 1-2,5 мг/кг.
  - 60. Способ по п.59, где композицию вводят еженедельно.
- 61. DsRNA по п.1 или 2 или фармацевтическая композиция по п.25 для применения в лечении порфирии у пациента, причем порфирия необязательно представляет собой печеночную порфирию или ост-

рую перемежающуюся порфирию (АІР), причем порфирия необязательно представляет собой острую печеночную порфирию.



Фиг. 1

Фермент, положение на	Катализируемая реакция	Связанная порфирия	Тип порфирии	Типичный тип	Типичные симптомы
хромосоме	Printagan	nop warm		наследования	
δ-	Глицин+сукцинилКоа				
аминолевулинат					
(ALA) синтаза 1	Į.				
	δ-аминолевулиновая				
3p21	кислота (АLА)				
δ-	Глицин+сукцинилКоа	Х-сцепленная	Эритропоэтическая	Х-спепленная	
аминолевулинат		сидеробластическая	* *		
(ALA) синтаза 2	1	анемия (XLSA) Х-спепленная			
(ALAS2)	δ-аминолевулиновая	протопорфирия			
	кислота (АLА)	(XLP)			
(эритроид-					
специфическая)					
Xp11.21					
δ-	δ-аминолевулиновая	Порфирия,	Печеночная	Аутосомно-	Боль в животе,
аминолевулинатдег	кислота (АLА)	обусловленная		рецессивная	нейропатия
ндратаза		недостаточностью			
(ALAD)	] ↓	ALA (ADP или			
		порфирня Досса)			
0-24	порфобилиноген (PBG)				
9q34 РВG-дезаминаза	Порфобилиноген	A	Печеночная	4	
РВС-дезаминаза (PBGD)	(PBG)	Острая	печеночная	Аутосомно-	Периодическая боль в животе.
(РВGD) или	(PDG)	перемежающаяся порфирия (AIP)		доминантная	периферическая
или гидроксиметилбила	L	порфирия (АТР)			нейропатия,
ндроксиметилонла неннтаза	*				психоневрологиче
(HMBS)	Гидроксиметилбилан				ские нарушения.
(IIIIII)	(НМВ)				тахикардия
	(*******)				
11q23					

Фиг. 2А

#### 036477

Уропорфириноген III синтаза (UROS) 10q26	Гидроксиметилбилан  ↓ Уропорфириноген III (URO)	Врожденная эритропоэтическая порфирия (СЕР)	Эритро- поэтическая	Аутосомно- рецессивная	Тяжелая фоточувствительность с эритемой, отечность и образование волдырей, гемолитическая анемия, спленомегалия
Уропорфириноген декарбоксилаза (UROD) 1q34	Уропорфириноген III (URO) ↓ Копропорфиноген III	Поздняя кожная порфирия (РСТ)	Печеночная	Аутосомно- доминантная или спорадическа я	Фоточувствительная с пузырьками и буллами
Копропорфириног ен III оксидаза (СРОХ) 3q12	Копропорфириноген III (COPRO) ↓ Протопорфириноген IX	Наследственная копропорфирия (НСР)	Печеночная	Аутосомно- доминантная	Фоточувствительность, неврологические симптомы, колики
Протопорфириног сноксидаза (РРОХ)	Протопорфириноген IX (PROTO)  ↓ Протопорфирин IX	Варисгатная порфирия (VP)	Смешанная	Аутосомно- доминантная	Фоточувствительность, неврологические симптомы, задержка развития
Феррохелатаза 18q21.3	Протопорфирин IX ↓ Гем	Эритропоэтическая протопорфирия (ЕРР)	Эритро- поэтическая	Аутосомно- рецессивная	Фоточувствительность с повреждениями кожи, камии в желчном пузыре, умеренное нарушение функции печения

## Фиг. 2В

```
1 ctgtatatta aggcgccggc gatcgcggcc tgaggctgct cccggacaag ggcaacgagc
 61 gtttcgtttg gacttctcga cttgagtgcc cgcctccttc gccgccgcct ctgcagtcct
 121 cagegoagtt atgeccagtt ettecegetg tggggacacg accaeggagg aatcettget
 181 tcagggactc gggaccctgc tggacccctt cctcgggttt aggggatgtg gggaccagga
 241 gaaagteagg atcoctaaga gtottccctg cctggatgga tgagtggctt cttctccacc
301 tagattett ceacaggage cagcatactt cetgaacatg gagagtgttg ttegeegetg
361 occattetta tecegagtee eccaggeett tetgeagaaa geaggeaaat etetgttgtt
421 ctatgcccaa aactgcccca agatgatgga agttggggcc aagccagccc ctcgggcatt
 481 gtocactgca gcagtacact accaacagat caaagaaacc cctccggcca gtgagaaaga
541 caaaactgct aaggecaagg teeaacagae teetgatgga teecagcaga gteeagatgg
601 cacacagett cegtetggac acceettgee tgccacaage cagggcactg caagcaaatg
661 occttteetg geageacaga tgaatcagag aggeageagt gtettetgea aagceagtet
 721 tgagetteag gaggatgtge aggaaatgaa tgeegtgagg aaagaggttg etgaaacete
 781 agcaggeece agtgtggtta gtgtgaaaac egatggaggg gateceagtg gactgetgaa
841 gaacttccag gacatcatgc aaaagcaaag accagaaaga gtgtctcatc ttcttcaaga
901 taacttgcca aaatctgttt ccacttttca gtatgatcgt ttctttgaga aaaaaattga
961 tgagaaaaag aatgaccaca cotatogagt ttttaaaact gtgaacoggo gagcacacat
1021 cttccccatg gcagatgact attcagactc cctcatcacc aaaaagcaag tgtcagtctg
1081 gtgcagtaat gactacctag gaatgagtcg ccacccacgg gtgtgtgggg cagttatgga
1141 cactttgaaa caacatggtg ctggggcagg tggtactaga aatatttctg gaactagtaa
1201 attecatgtg gacttagage gggagetgge agacetecat gggaaagatg eegeactett
1261 gttttcctcg tgctttgtgg ccaatgactc aaccctcttc accctggcta agatgatgcc
1321 aggetgtgag atttactetg attetgggaa ceatgeetee atgatecaag ggattegaaa
1381 cagccgagtg ccaaagtaca tottccgcca caatgatgtc agccacctca gagaactgct
1441 gcaaagatet gaccetcag teeccaagat tgtggcattt gaaactgtee atteaatgga
1501 tggggcggtg tgcccactgg aagagctgtg tgatgtggcc catgagtttg gagcaatcac
1561 cttcgtggat gaggtccacg cagtggggct ttatggggct cgaggcggag ggattgggga
1621 togggatgga gtoatgccaa aaatggacat catttotgga acacttggca aagcotttgg
1681 ttgtgttgga gggtacatcg ccagcacgag ttctctgatt gacaccgtac ggtcctatgc
1741 tgctggcttc atcttcacca cctctctgcc acccatgctg ctggctggag ccctggagtc
1801 tgtgcggatc ctgaagagcg ctgagggacg ggtgcttcgc cgccagcacc agcgcaacgt
1861 caaacteatg agacagatge taatggatge eggeeteect gttgteeact geeceageea
1921 catcatccct gtgcgggttg cagatgctgc taaaaacaca gaagtctgtg atgaactaat
1981 gagcagacat aacatctacg tgcaagcaat caattaccct acggtgcccc ggggagaaga
2041 getectacgg attgececca ecceteacca cacaccecag atgatgaact acttecttga
2101 gaatctgcta gtcacatgga agcaagtggg gctggaactg aagcctcatt cctcagctga
2161 qtqcaacttc tqcaqqaqqc cactqcattt tqaaqtqatq aqtqaaaqaq aqaaqtccta
2221 tttctcaggc ttgagcaagt tggtatctgc tcaggcctga gcatgacctc aattatttca
```

#### Фиг. 3А

```
2281 cttaacccca ggccattate atatecagat ggtetteaga gttgtettta tatgtgaatt
2341 aagttatatt aaattttaat etatagtaaa aacatagtee tggaaataaa ttettgetta
2401 aatggtg
(SEQ ID NO:1)
```

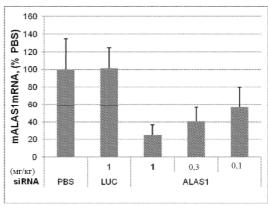
Фиг. 3В

```
1 cagaagaagg cagcgccaa ggcgcatgcg cagcggtcac tcccgctgta tattaaggcg
  61 coggogatog oggoctgagg otgotocogg acaagggcaa ogagogtito gittggacti
 121 ctcgacttga gtgcccgcct ccttcgccgc cgcctctgca gtcctcagcg cagttatgcc
 181 cagttettee egetgtgggg acacgaceae ggaggaatee ttgetteagg gaetegggae
 241 cctgctggac cccttcctcg ggtttagggg atgtggggac caggagaaag tcaggatccc
 301 taagagtett ecetgeetgg atggatgagt ggettettet eeacetagat tettteeaca
 361 ggagccagca tacttcctga acatggagag tgttgttcgc cgctgcccat tcttatcccg
 421 agtoccccag gcctttctgc agaaagcagg caaatctctg ttgttctatg cccaaaactg
 481 ccccaagatg atggaagttg gggccaagcc agcccctcgg gcattgtcca ctgcagcagt
 541 acactaccaa cagatcaaag aaacccctcc ggccagtgag aaagacaaaa ctgctaaggc
601 caaggtccaa cagacteetg atggateeca geagagteea gatggcacae agetteegte
 661 tggacacccc ttgcctgcca caagccaggg cactgcaagc aaatgccctt tcctggcagc
721 acagatgaat cagagaggca gcagtgtctt ctgcaaagcc agtcttgagc ttcaggagga
 781 tgtgcaggaa atgaatgccg tgaggaaaga ggttgctgaa acctcagcag gccccagtgt
 841 ggttagtgtg aaaaccgatg gaggggatcc cagtggactg ctgaagaact tccaggacat
 901 catgcaaaag caaagaccag aaagagtgtc tcatcttctt caagataact tgccaaaatc
961 tgtttccact tttcagtatg atcgtttctt tgagaaaaaa attgatgaga aaaagaatga
1021 ccacacctat cgagttitta aaactgtgaa ccggcgagca cacatcttcc ccatggcaga
1081 tgactattca gactecetca tcaccaaaaa gcaagtgtca gtctggtgca gtaatgacta
1141 cctaggaatg agtegeeace caegggtgtg tggggeagtt atggaeactt tgaaacaaca
1201 tggtgetggg geaggtggta etagaaatat ttetggaact agtaaattee atgtggaett
1261 agagcgggag ctggcagacc tccatgggaa agatgccgca ctcttgtttt cctcgtgctt
1321 tgtggccaat gactcaacco tottcaccot ggctaagatg atgccaggot gtgagattta
1381 ctctgattct gggaaccatg cctccatgat ccaagggatt cgaaacagcc gagtgccaaa
1441 gtacatette egecacaatg atgteageca ecteagagaa etgetgeaaa gatetgacee
1501 ctcagtcccc aagattgtgg catttgaaac tgtccattca atggatgggg cggtgtgccc
1561 actggaagag ctgtgtgatg tggcccatga gtttggagca atcaccttcg tggatgaggt
1621 ccacqcaqtq qqqctttatq qqqctcqaqq cqqaqqqatt qqqqatcqqq atqqaqtcat
1681 gecaaaaatg gacatcattt etggaacact tggcaaagee tttggttgtg ttggagggta
1741 catcgccage acgagttete tgattgacae cgtacggtce tatgetgetg getteatett
1801 caccacctet etgecaccca tgetgetgge tggagecetg gagtetgtge ggateetgaa
1861 gagggetgag ggaggggtge ttegeegeea geaceagege aacgteaaac teatgagaea
1921 gatgetaatg gatgeeggee teeetgttgt eeactgeece agecacatea teeetgtgeg
1981 ggttgcagat gctgctaaaa acacagaagt ctgtgatgaa ctaatgagca gacataacat
2041 ctacgtgcaa gcaatcaatt accctacggt gccccgggga gaagagctcc tacggattgc
2101 coccaccot caccacaca cocagatgat gaactacttc cttgagaatc tgctagtcac
2161 atggaagcaa gtggggctgg aactgaagcc tcattcctca gctgagtgca acttctgcag
2221 gaggecactg cattttgaag tgatgagtga aagagagaag teetatttet caggettgag
```

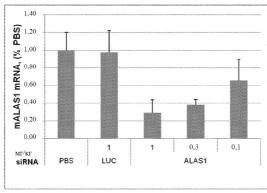
## Фиг. 4А

2281 caagttggta tctgctcagg cctgagcatg acctcaatta tttcacttaa ccccaggcca 2341 ttatcatatc cagatggtct tcagagttgt ctttatatgt gaattaagtt atattaaatt 2401 ttaatctata gtaaaaacat agtcctggaa ataaattctt gcttaaatgg tgaaaaaa (SEO ID NO:382)

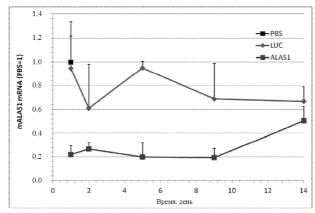
### Фиг. 4В



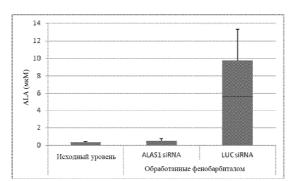
Фиг. 5



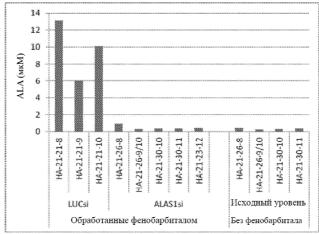
Фиг. 6



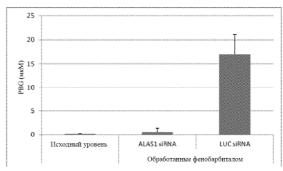
Фиг. 7



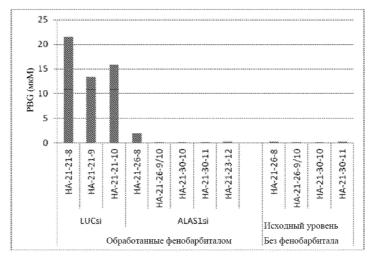
Фиг. 8



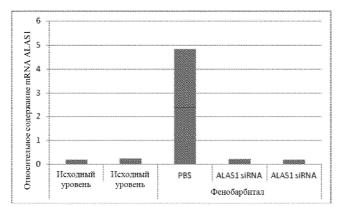
Фиг. 9



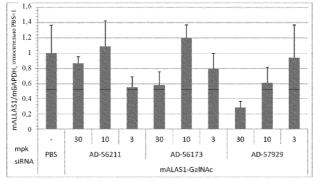
Фиг. 10



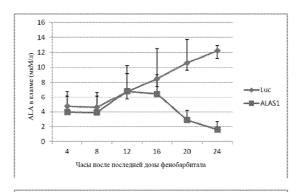
Фиг. 11

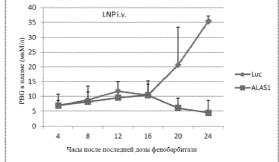


Фиг. 12

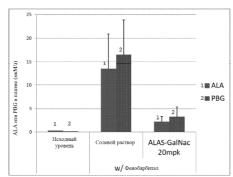


Фиг. 13

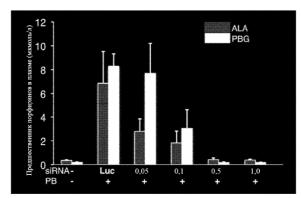




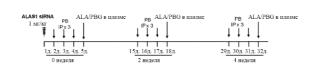
Фиг. 14

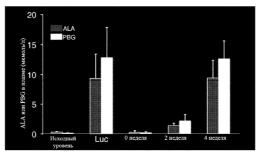


Фиг. 15

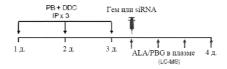


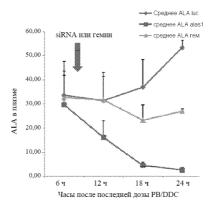
Фиг. 16

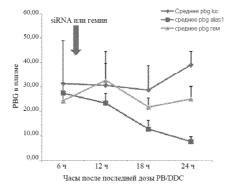




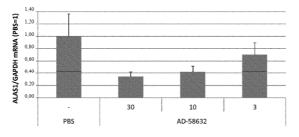
Фиг. 17



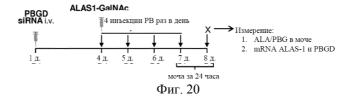


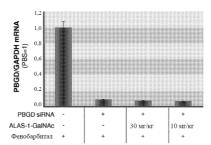


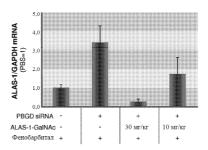
Фиг. 18



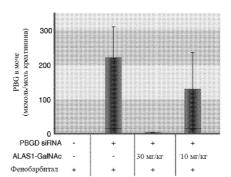
Фиг. 19

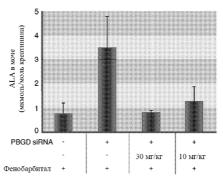




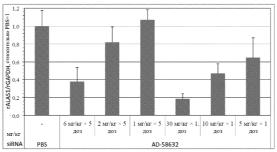


Фиг. 21

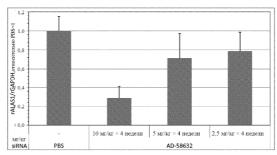




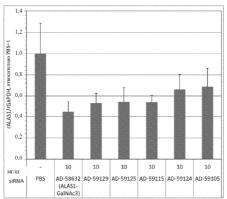
Фиг. 22



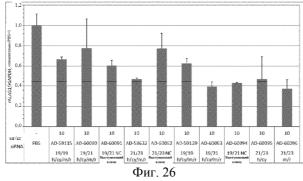
Фиг. 23

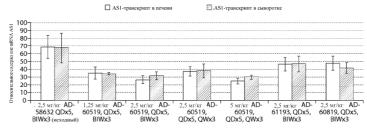


Фиг. 24

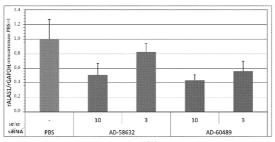


Фиг. 25

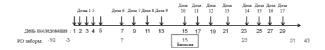




Фиг. 27

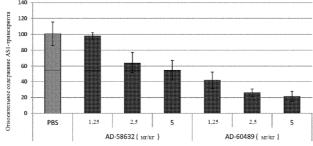


Фиг. 28

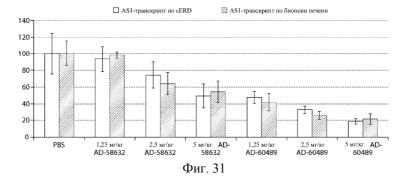


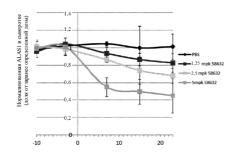
№ группы	Число самцов	Исследуемый препарат	Уровень дозы (мг/кг)	Конц. дозы (мг/мл)	Схема введения дозы	Объем дозы (мл/кг)	Путь введения
ililii iii	3111	Harrian II	9				1111
2	3	AD-58632	5	2,5	Раз в день. 5		
3	3	AD-38632	2.5	1.25	дисй, с		
4	3	AD-58632	1,25	0.625	Temportust 200	es to the set of advantage of	
1114	3	AD-60489	4	2.5	введением раз	I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	
6	3	AD-60489	2,5	1,25	и два дия. 3 непосия		
		AD-60489	1,25	0.625	HCACIO	11111111111	
введения до	зы) гени для mRN	A: 15** день (**C	ыворотку собі			обирали до г	овторного

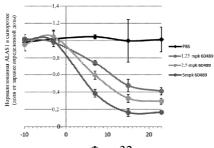
Фиг. 29



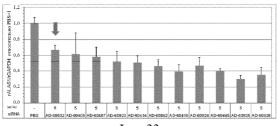
Фиг. 30



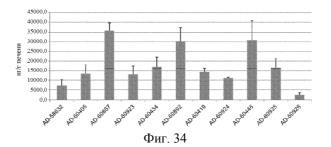




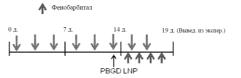
Фиг. 32

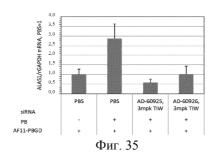


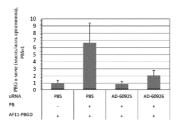
Фиг. 33

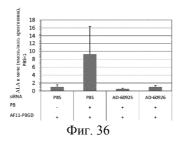


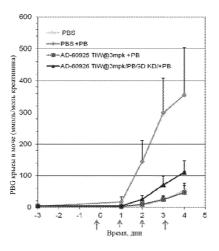
ALAS-GaINAc 3 MT/kT (TIW)

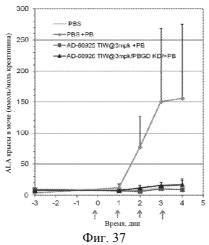


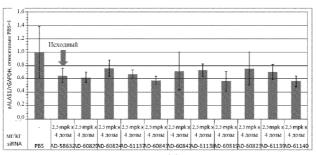




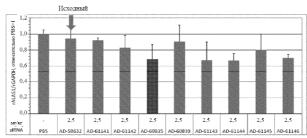




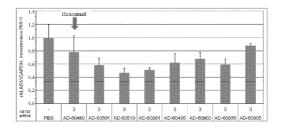


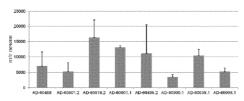


Фиг. 38

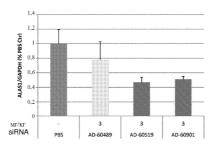


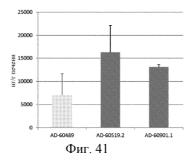
Фиг. 39

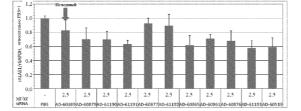




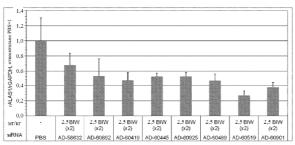
Фиг. 40



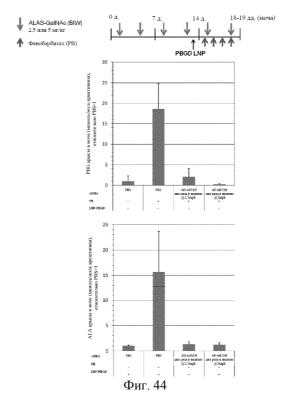


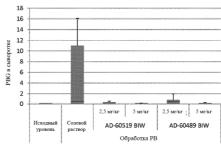


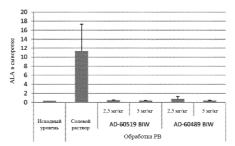
Фиг. 42



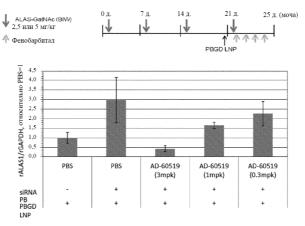
Фиг. 43



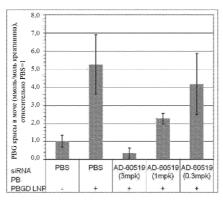


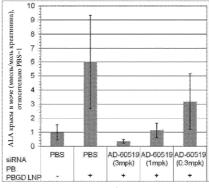


Фиг. 45

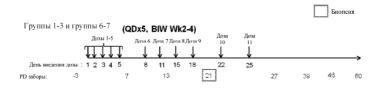


Фиг. 46





Фиг. 47

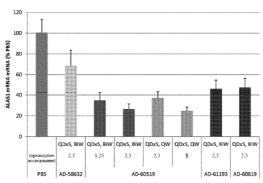


Группы 4-5 (QDx5, QW Wk2-4)

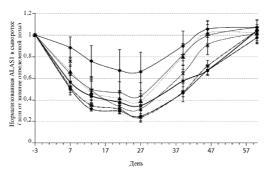
Дозы 1-5

Дозы 6

Дозы 7

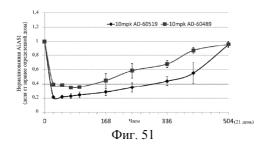


Фиг. 49



- -- 2,5 MIT/KIT AD-60519, QDx5, QWx3
- → 2.5 мг/кг AD-58632 QDx5, BIWx3
   → 5 мг/кг AD-60519, QDx5, QWx3
   → 2.5 мг/кг AD-60519, QDx5, BIWx3
   → 2.5 мг/кг AD-60519, QDx5, BIWx3
   → 2.5 мг/кг AD-60819, QDx5, BIWx3
   → 2.5 мг/кг AD-60819, QDx5, BIWx3

Фиг. 50





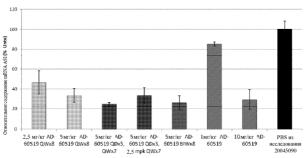
Группа 5 (BIW x8 недель)



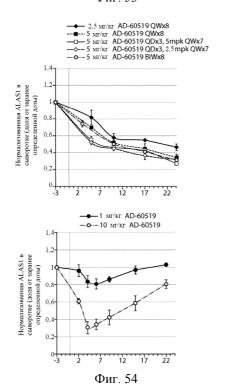
Группы 6-7 (разовая доза)

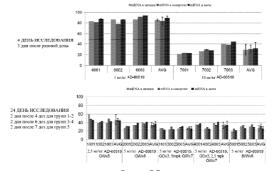


Фиг. 52

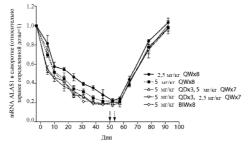


Фиг. 53

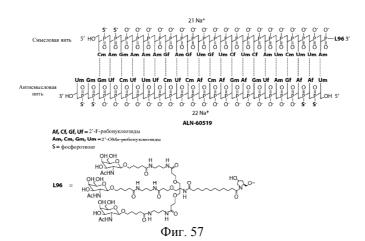


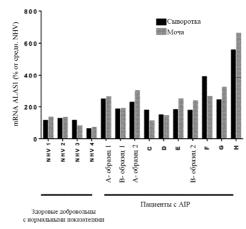


Фиг. 55



Фиг. 56





Фиг. 58