

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191433 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.30

(22) Дата подачи заявки
2014.05.22

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA SERPINA1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/826,125; 61/898,695; 61/979,727;
61/989,028

(32) 2013.05.22; 2013.11.01; 2014.04.15;
2014.05.06

(33) US

(62) 201592223; 2014.05.22

(71) Заявитель:
ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Сехгал Алфика, Хариссе Клаус,
Беттенкорт Брайан, Майер Мартин,
Раджив Каллантхоттатхил Г., Хинкл
Грегори, Манохаран Мутхиах (US)

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

(57) Изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, нацеленным на ген *Serpina1*, и способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии *Serpina1*, а также к способам лечения субъектов с ассоциированным с *Serpina1* заболеванием, таким как нарушение печени.

A1

202191433

202191433

A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ *irna SERPINA1* И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯРодственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/826125, поданной 22 мая 2013 г.; предварительной заявки на патент США № 61/898695, поданной 1 ноября 2013 г.; предварительной заявки на патент США № 61/979727, поданной 15 апреля 2014 г.; и предварительной заявки на патент США № 61/989028, поданной 6 мая 2014 г. Данная заявка является родственной предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., и РСТ/US2012/065601, поданной 16 ноября 2012 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок на патенты тем самым включено в данный документ посредством 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 посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия файла с кодировкой ASCII, созданная 20 мая 2014 г., имеет название 121301-00620_SL.txt, и ее размер составляет 199204 байт.

Уровень техники

Serpinal кодирует альфа-1-антитрипсин, который преимущественно образует комплекс с нейтрофильной эластазой, продуцируемой гепатоцитами, одноядерными моноцитами, альвеолярными макрофагами, энтероцитами и миелоидными клетками, и ингибирует ее активность. Субъекты, имеющие вариации одной или обеих копий гена Serpinal, могут страдать недостаточностью альфа-1-антитрипсина и подвергаться риску развития эмфиземы легких и/или хронической болезни печени из-за превышающей нормальную активности эластазы в легких и печени.

У пораженных заболеванием субъектов недостаточность альфа-1-антитрипсина является недостаточностью функционального альфа-1-антитрипсина дикого типа. В одних случаях субъект с вариацией в одной или обеих копиях гена Serpinal несет нулевой аллель. В других случаях субъект с вариацией в одной или обеих копиях

гена *Serpinal* несет дефицитный аллель.

Например, у субъекта с дефицитным аллелем *Serpinal*, таким как аллель *PIZ*, могут продуцироваться неправильно свернутые белки, которые не могут надлежащим образом транспортироваться из участка синтеза в участок действия в организме. Такие субъекты, как правило, подвергаются риску развития болезни легких и/или печени. Субъекты с нулевым аллелем *Serpinal*, таким как *PINULL* ("Granite Falls"), как правило, подвергаются риску развития только болезни легкого.

Болезнь печени, возникающая из-за недостаточности альфа-1-антитрипсина, является результатом вариантных форм альфа-1-антитрипсина, продуцируемого в клетках печени, являющегося неправильно свернутым и, таким образом, с трудом транспортируемого из клеток. Это ведет к накоплению неправильно свернутого белка в клетках печени и может вызвать одно или несколько заболеваний или нарушений печени, в том числе без ограничения хроническую болезнь печени, воспаление печени, цирроз, фиброз печени и/или печеночноклеточную карциному.

На данный момент имеются довольно ограниченные возможности лечения пациентов с болезнью печени, возникающей из-за недостаточности альфа-1-антитрипсина, в том числе вакцинация против гепатита, поддерживающее лечение и исключение наносящих вред средств (например, спирта и NSAID). Хотя существует замещающая альфа-1-антитрипсин терапия, такое лечение не влияет на болезнь печени у таких субъектов, и хотя трансплантация печени может быть эффективна, она является трудной, дорогой и рискованной процедурой, и печень нелегко получить.

Следовательно, в данной области существует потребность в эффективных методах лечения *Serpinal*-ассоциированных заболеваний, таких как хроническая болезнь печени, воспаление печени, цирроз, фиброз печени и/или печеночноклеточная карцинома.

Краткое описание изобретения

Как описывается более подробно ниже, в данном документе раскрываются композиции, содержащие средства, например, однонитевые и двухнитевые полинуклеотиды, например, средства

для RNAi, например, двухнитевые средства на основе iRNA, нацеливающиеся на Serpinal. Также раскрываются способы с использованием композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии Serpinal и для лечения ассоциированных с Serpinal заболеваний, например, хронической болезни печени, воспаления печени, цирроза, фиброза печени и/или печеночноклеточной карциномы.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к двухнитевым средствам для RNAi для ингибирования экспрессии Serpinal в клетке. Двухнитевые средства для RNAi содержат смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

Согласно одному варианту осуществления одно из отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключается в ошибочном спаривании нуклеотидов в затравочной области антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

Согласно одному варианту осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить и антисмысловая нить содержат участок комплементарности, который

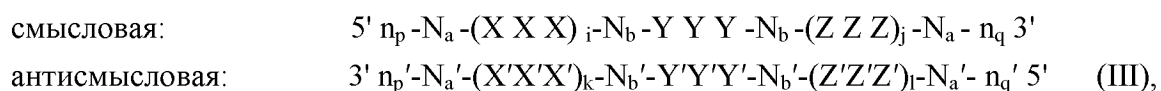
содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из последовательностей, приведенных в любой из таблиц 1, 2, 5, 7, 8 и 9.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого нуклеотида дезокси-тимин (dT), 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, лишённого азотистого основания нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, содержащего синтетическое основание нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфоротиоатную группу, и концевого нуклеотида, соединённого с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

Согласно другому варианту осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию *Serpinal* в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, практически комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, практически комплементарный части mRNA, кодирующей *Serpinal*, где каждая нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):



где

каждый из i , j , k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p , p' , 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 по-разному 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' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, 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'; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

Согласно одному варианту осуществления N_a' содержит 1-25 нуклеотидов, и где один из 1-25 нуклеотидов в одном из положений 2-9 от 5'-конца характеризуется ошибочным спариванием нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления ошибочно спаренным основанием является универсальное основание.

Согласно одному варианту осуществления i равняется 0; j равняется 0; i равняется 1; j равняется 1; как i , так и j равняются 0, или как i , так и j равняются 1. Согласно другому варианту осуществления k равняется 0; l равняется 0; k равняется 1; l равняется 1; как k , так и l равняются 0; или как k , так и l равняются 1.

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

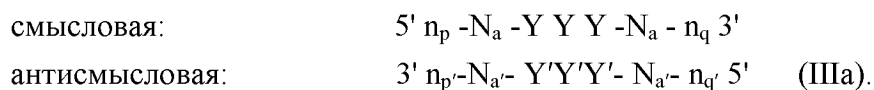
Согласно одному варианту осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

Согласно одному варианту осуществления мотив Y'Y'Y'

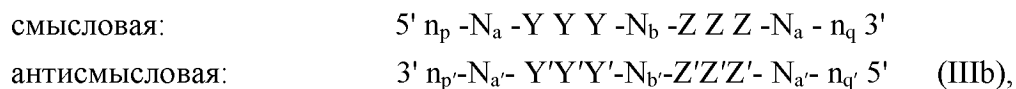
находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой нити от 5'-конца.

Согласно одному варианту осуществления Y' представляет собой 2'-О-метил.

Согласно одному варианту осуществления формула (III) представлена формулой (IIIa):

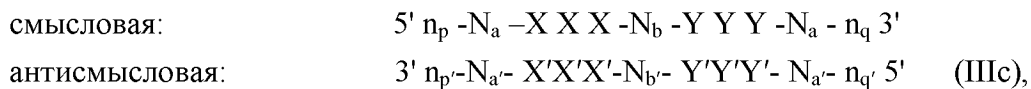


Согласно другому варианту осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):



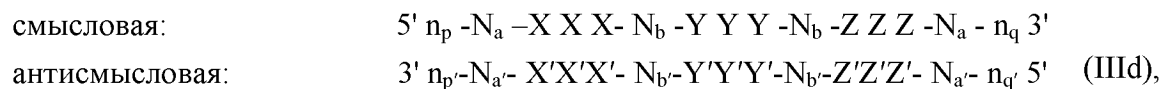
где каждый N_b и $N_{b'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

Согласно еще одному варианту осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):



где каждый N_b и $N_{b'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

Согласно еще одному варианту осуществления формула (III) представлена формулой (IIId):



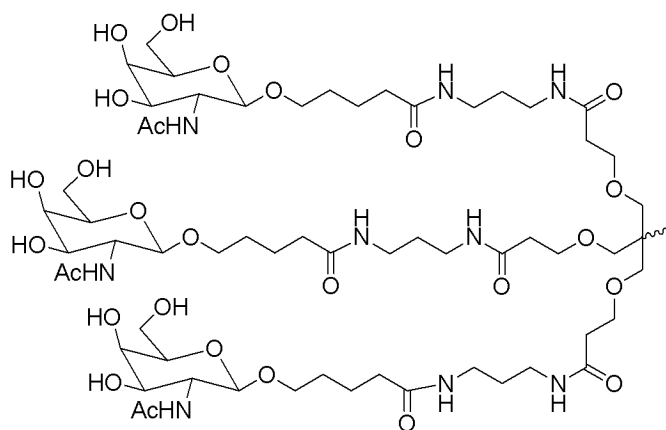
где каждый N_b и $N_{b'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, а каждый N_a и $N_{a'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 15-30 пар нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 17-23 пары нуклеотидов. Согласно еще одному варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 17-25 пар

нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 23-27 пар нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 19-21 пару нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 21-23 пары нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

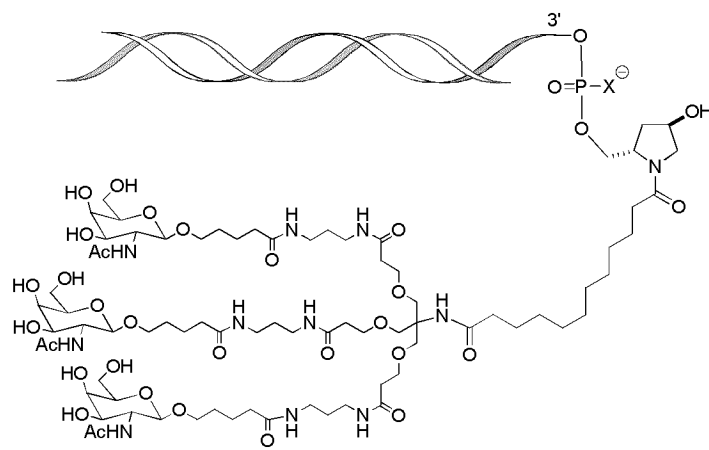
Согласно одному варианту осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-O-алкила, 2'-O-аллила, 2'-C-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксиде, 2'-гидроксила и их комбинаций. Согласно другому варианту осуществления модификациями нуклеотидов являются 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации.

Согласно одному варианту осуществления лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно другому варианту осуществления лиганд представляет собой



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

В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S. В конкретном варианте осуществления X представляет собой O.

Согласно одному варианту осуществления средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиаатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту осуществления фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити. Согласно одному варианту осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. Согласно другому варианту осуществления нить представляет собой смысловую нить.

Согласно одному варианту осуществления фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити. Согласно одному варианту осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. Согласно другому варианту осуществления нить представляет собой смысловую нить.

Согласно одному варианту осуществления фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити. Согласно одному варианту осуществления нить представляет собой антисмысловую нить.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi содержит 6-8 фосфоротиаатных межнуклеотидных связей. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит две фосфоротиаатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиаатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфоротиаатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

Согласно одному варианту осуществления парой оснований в 1

положении 5'-конца антисмысловой нити дуплекса является пара оснований AU.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотиды Y имеют 2'-фтор-модификацию.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотиды Y' имеют 2'-O-метил-модификацию.

Согласно одному варианту осуществления $p' > 0$. Согласно другому варианту осуществления $p' = 2$.

Согласно одному варианту осуществления $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, а выступающие нуклеотиды p' комплементарны целевой mRNA. Согласно другому варианту осуществления $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, а выступающие нуклеотиды p' не комплементарны целевой mRNA.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один p_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи.

Согласно одному варианту осуществления все p_p' связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфотиоатных связей.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, приведенных в любой из таблиц 1, 2, 5, 7, 8 и 9.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-58681, AD-59054, AD-61719 и AD-61444.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к двухнитевому средству для RNAi для ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке. Двухнитевые средства для RNAi содержат смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11,

а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25, где практически все нуклеотиды смысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

Согласно одному варианту осуществления одно из отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключается в ошибочном спаривании нуклеотидов в затравочной области антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

Согласно одному варианту осуществления все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити имеют модификацию.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию *Serpinal* в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, практически комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, практически комплементарный части mRNA, кодирующей *Serpinal*, где каждая нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

$$\begin{array}{ll}
 \text{смысловая:} & 5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3' \\
 \text{антисмысловая:} & 3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' \quad (\text{III}),
 \end{array}$$

где

каждый из i , j , k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p , p' , 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 по-разному 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' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, 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, и где модификациями являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y , а модификации N_b' отличаются от модификации Y' ; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию *Serpinal* в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, практически комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, практически комплементарный части mRNA, кодирующей *Serpinal*, где каждая нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено

формулой (III):

$$\begin{array}{ll} \text{смысловая:} & 5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3' \\ \text{антисмысловая:} & 3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' \end{array} \quad (\text{III}),$$

где

каждый из i , j , k и l независимо равняется 0 или 1;

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

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 по-разному 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;

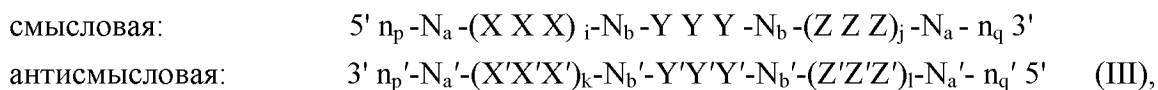
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификациями являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию *Serpinal* в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, практически комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, практически комплементарный части mRNA, кодирующей *Serpinal*, где каждая

нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):



где

каждый из i , j , k и l независимо равняется 0 или 1;

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

каждый из p , q и q' независимо равняется 0–6;

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

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 по-разному 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;

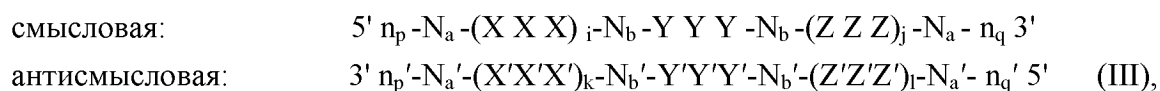
каждый из XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификациями являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y , а модификации N_b' отличаются от модификации Y' ; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию *Serpinal* в клетке, где

двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, практически комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, практически комплементарный части mRNA, кодирующей Serpina1, где каждая нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):



где

каждый из i , j , k и l независимо равняется 0 или 1;

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

каждый из p , q и q' независимо равняется 0–6;

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

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 по-разному 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 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, и где модификациями являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

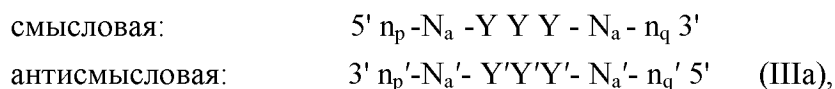
модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y';

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним

лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию *Serpinal* в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, практически комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, практически комплементарный части mRNA, кодирующей *Serpinal*, где каждая нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):



где

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

каждый из p , q и q' независимо равняется 0–6;

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотриатной связи;

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 по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый из YYY и $Y'Y'Y'$ независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотриатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных

GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту осуществления Na' содержит 1-25 нуклеотидов, где один из 1-25 нуклеотидов в одном из положений 2-9 от 5'-конца характеризуется ошибочным спариванием нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления ошибочно спаренным основанием является универсальное основание.

Настоящее изобретение также предусматривает клетки, векторы, клетки-хозяева и фармацевтические композиции, содержащие двухнитевые средства для RNAi согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству для RNAi, выбранному из группы средств для RNAi, приведенных в любой из таблиц 1, 2, 5, 7, 8 и 9.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида. Средство способно ингибировать экспрессию *Serpina1* в клетке и содержит последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в любой из таблиц 1, 2, 5, 7, 8 и 9, где полинуклеотид составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке, содержащей двухнитевое средство для RNAi согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi вводят при помощи фармацевтической композиции.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления средство для RNAi вводят в растворе. В некоторых таких вариантах осуществления siRNA вводят в небуферном растворе. Согласно одному варианту осуществления siRNA вводят в воде. Согласно другим вариантам осуществления siRNA вводят при помощи буферного раствора, такого как ацетатный буфер, цитратный буфер, буфер с проламином, карбонатный буфер или фосфатный буфер, или любая их комбинация. Согласно некоторым вариантам

осуществления буферным раствором является забуференный фосфатом солевой раствор (PBS).

Согласно одному варианту осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат липидный состав. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке. Способы предусматривают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например с двухнитевым средством для RNAi, композицией, вектором или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению; и поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления mRNA-транскрипта гена *Serpinal*, с ингибированием тем самым экспрессии гена *Serpinal* в клетке.

Согласно одному варианту осуществления клетка находится в субъекте.

Согласно одному варианту осуществления субъект является человеком.

В одном варианте осуществления экспрессию mRNA ингибируют по меньшей мере приблизительно на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта с ассоциированным с *Serpinal* заболеванием. Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухнитевого средства для RNAi, композиции, вектора или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, с лечением тем самым субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта с *Serpinal*-ассоциированным нарушением. Способы предусматривают подкожное введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, где практически все нуклеотиды смысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце, с лечением тем самым субъекта.

Согласно одному варианту осуществления одно из отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключается в ошибочном спаривании нуклеотидов в затравочной области антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

Согласно одному варианту осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

Согласно одному варианту осуществления ассоциированным с *Serpinal* заболеванием является нарушение печени, например, хроническая болезнь печени, воспаление печени, цирроз, фиброз печени и/или печеночноклеточная карцинома.

Согласно одному варианту осуществления введение средства для RNAi субъекту приводит к уменьшению цирроза печени, фиброза и/или накопления белка *Serpinal* в печени. Согласно другому

варианту осуществления введение средства для RNAi субъекту приводит, например дополнительно приводит, к уменьшению воспаления легких.

Согласно одному варианту осуществления субъектом является человек.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования развития печеночноклеточной карциномы у субъекта с дефектным вариантом *Serpinal*. Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухнитевого средства для RNAi, композиции, вектора или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, с ингибированием тем самым развития печеночноклеточной карциномы у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования развития печеночноклеточной карциномы у субъекта с дефектным вариантом *Serpinal*. Способы предусматривают подкожное введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, где практически все нуклеотиды смысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце, с ингибированием развития печеночноклеточной карциномы у субъекта с дефектным вариантом *Serpina1*.

Согласно одному варианту осуществления одно из отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключается в ошибочном спаривании нуклеотидов в затравочной области антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

Согласно одному варианту осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

Согласно одному варианту осуществления субъектом является примат или грызун. Согласно другому варианту осуществления субъектом является человек.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от

приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. Согласно другому варианту осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят в дозе приблизительно 3 мг/кг. Согласно другому варианту осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг. Согласно другому варианту осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе приблизительно 0,5 мг/кг два раза в неделю. Согласно еще одному варианту осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг один раз в две недели. Согласно еще одному варианту осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 мг/кг один раз в неделю.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят два раза в неделю. Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi вводят один раз в две недели.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам снижения накопления неправильно свернутого Serpinal в печени субъекта с дефектным вариантом Serpinal. Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухнитевого средства для RNAi, композиции, вектора или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, с уменьшением тем самым накопления неправильно свернутого Serpinal в печени субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам снижения накопления неправильно свернутого Serpinal в печени субъекта с дефектным вариантом Serpinal. Способы предусматривают подкожное введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и

антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфотриоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотриоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, где практически все нуклеотиды смысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфотриоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце, с уменьшением тем самым накопления неправильно свернутого Serpinal в печени субъекта с дефектным вариантом Serpinal.

Согласно одному варианту осуществления одно из отличий по 3 нуклеотидам в нуклеотидной последовательности антисмысловой нити заключается в ошибочном спаривании нуклеотидов в затравочной области антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

Согласно одному варианту осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

Согласно одному варианту осуществления субъектом является примат или грызун. Согласно другому варианту осуществления

субъектом является человек.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. Согласно другому варианту осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi, например двухнитевое средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

Краткое описание графических материалов

На фигуре 1 представлен график, изображающий *in vivo* эффективность и продолжительность ответа для указанных siRNA у трансгенных мышей, экспрессирующих форму Z-ААТ ААТ человека.

На фигурах 2А-2В показана *in vivo* эффективность siRNA при низких значениях IC₅₀. Трансгенным мышам, экспрессирующим аллель Z-ААТ человека, вводили 10 мг/кг дуплекса siRNA в день 0, а затем уровень сывороточного ААТ человека отслеживали в течение 21 дня после введения дозы (фигура 2А). Каждая точка представляет среднее для трех мышей, а планки погрешностей отражают стандартное отклонение. На фигуре 2В показаны уровни mRNA hAAT в печени, нормализованные по GAPDH для каждой группы. Столбики отражают среднее, а планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

На фигурах 3А-3С показана длительная дозозависимая супрессия ААТ. На фигуре 3А специально показана кривая эффективности, изображающая максимальное снижение уровней сывороточного белка hAAT, достигаемых при различных дозах AD-59054, введенных подкожно трансгенным мышам. Каждая точка представляет среднее для трех животных, а планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Продолжительность снижения после одной дозы siRNA ААТ при 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг показана на фигуре 3В. Уровни hAAT нормализовали к среднему трех

образцов до введения средства для каждого животного. Обработанная PBS группа служит контролем для отображения вариабельности уровней сывороточного hAAT. Каждая точка представляет среднее для трех животных, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Согласно фигуре 3С животным вводили AD-59054 в дозе 0,5 мг/кг два раза в неделю. Каждая точка представляет средний относительный уровень сывороточного hAAT для четырех животных, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

На фигурах 4А-4D показана пониженная частота опухолей с уменьшением уровня Z-AAT. На фигуре 4А представлена схема исследования, при которой старым мышам с фиброзом печени один раз в две недели (Q2W) подкожно вводили дозу PBS или 10 мг/кг дуплекса siRNA AD58681 в количестве 11 доз и умерщвляли через 7 дней после последней дозы. На фигуре 4В показаны уровни mRNA hAAT в печени в контрольной группе и группах с обработкой. На фигуре 4С показаны уровни mRNA Colla2 в печени в контрольной группе и группах с обработкой. На фигуре 4D показаны уровни mRNA PtPrc в печени в контрольной группе и группах с обработкой.

На фигурах 5А-4С показана пониженная частота опухолей с уменьшением уровня Z-AAT. Собирали образцы сыворотки от мышей, обработанных согласно схеме исследования, представленной на фигуре 4А, для наблюдения за степенью супрессии hAAT. На фигуре 5А показаны уровни сывороточного белка hAAT после первой дозы. На фигуре 5В и фигуре 5С показано PAS окрашивание срезов печени от двух однопометников, обработанных либо PBS, либо siRNA AAT. Окрашенные в более темный цвет точки представляют шарики или агрегаты Z-AAT.

На фигуре 6 показана *in vivo* эффективность указанных соединений.

На фигурах 7А и 7В представлены графики, изображающие продолжительность снижения уровня AAT у отличных от человека приматов после одной дозы AD-59054, AD-61719 или AD-61444 при дозе 1 мг/кг (7А) или 3 мг/кг (7В). Каждая точка представляет среднее для трех животных, а планки погрешностей показывают

стандартное отклонение.

На фигуре 8А показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 1 (SEQ ID NO:1); на фигуре 8В показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 3 (SEQ ID NO:2); на фигуре 8С показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 2 (SEQ ID NO:3); на фигуре 8D показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 4 (SEQ ID NO:4); на фигуре 8Е показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 5 (SEQ ID NO:5); на фигуре 8F показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 6 (SEQ ID NO:6); на фигуре 8G показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 7 (SEQ ID NO:7); на фигуре 8H показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 8 (SEQ ID NO:8); на фигуре 8I показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 9 (SEQ ID NO:9); на фигуре 8J показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 10 (SEQ ID NO:10); на фигуре 8K показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Homo sapiens*, вариант транскрипта 11 (SEQ ID NO:11); на фигуре 8L показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Macaca mulatta* (SEQ ID NO:12); на фигуре 8M показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Macaca mulatta* , вариант транскрипта 6 (SEQ ID NO:13); на фигуре 8N показана нуклеотидная последовательность *Serpinal Macaca mulatta* , вариант транскрипта 4 (SEQ ID NO:14); на фигуре 8O показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:15); на фигуре 8P показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:16); на фигуре 8Q показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:17); на фигуре 8R показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO:18); на фигуре 8S показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO:19); на фигуре

8T показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:6 (SEQ ID NO:20); на фигуре 8U показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:7 (SEQ ID NO:21); на фигуре 8V показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:8 (SEQ ID NO:22); на фигуре 8W показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:9 (SEQ ID NO:23); на фигуре 8X показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO:24); на фигуре 8Y показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:11 (SEQ ID NO:25); на фигуре 8Z показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:12 (SEQ ID NO:26); на фигуре 8AA показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:13 (SEQ ID NO:27); и на фигуре 8AB показана последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:14 (SEQ ID NO:28).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим средства, например, одノンитевые и двухнитевые олигонуклеотиды, например, средства для RNAi, например, двухнитевые средства на основе iRNA, нацеливающиеся на Serpinal. Также раскрываются способы с использованием композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии Serpinal и для лечения ассоциированных с Serpinal заболеваний, таких как нарушения печени, например, хронической болезни печени, воспаления печени, цирроза, фиброза печени и/или печеночноклеточной карциномы.

I. Определения

Для того, чтобы настоящее изобретение можно было более легко понять, вначале даны определения соответствующим терминам. Кроме того, следует отметить, что в случаях, когда в данном документе перечисляются значение или диапазон значений переменной, подразумевают, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов статьи. В качестве примера,

"элемент" означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

Термин "включающий" используют в данном документе для обозначения фразы "включающий без ограничения" и используют взаимозаменяемо с ней.

Термин "или" используют в данном документе для обозначения термина "и/или" и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает иное.

При использовании в данном документе "Serpinal" относится к ингибитору серпинпептидазы клада А, представителю 1 гена или белка. Serpinal также известна как альфа-1-антитрипсин, α -1-антитрипсин, ААТ, ингибитор протеазы 1, PI, PI1, антиэластаза и антитрипсин.

Термин "Serpinal" включает в себя Serpinal человека, аминокислотная и нуклеотидная последовательность которой может быть найдена, например, под номерами доступа в GenBank GI:189163524 (SEQ ID NO:1), GI:189163525 (SEQ ID NO:2), GI:189163526 (SEQ ID NO:3), GI:189163527 (SEQ ID NO:4), GI:189163529 (SEQ ID NO:5), GI:189163531 (SEQ ID NO:6), GI:189163533 (SEQ ID NO:7), GI:189163535 (SEQ ID NO:8), GI:189163537 (SEQ ID NO:9), GI:189163539 (SEQ ID NO:10) и/или GI:189163541 (SEQ ID NO:11); Serpinal резус, аминокислотная и нуклеотидная последовательность которой может быть найдена, например, под номерами доступа в GenBank GI:402766667 (SEQ ID NO:12), GI:297298519 (SEQ ID NO:13) и/или GI: 297298520 (SEQ ID NO:14); Serpinal мыши, аминокислотная и нуклеотидная последовательность которой может быть найдена, например, под номерами доступа в GenBank GI:357588423 и/или GI:357588426; и крысы, аминокислотная и нуклеотидная последовательность которой может быть найдена, например, под номером доступа в GenBank GI:77020249. Дополнительные примеры последовательностей mRNA Serpinal легко доступны при использовании, например, GenBank и OMIM.

Было идентифицировано свыше 120 аллелей Serpinal, и аллель "М" считается аллелем дикого типа или "нормальным" аллелем (например, "PIM1-ALA213" (также известный как PI, M1A), "PIM1-

VAL213" (также известный как PI, MIV), "PIM2", "PIM3" и PIM4").
Дополнительные варианты можно найти, например, в базе данных A(1)ATVar (см., например, Zaimidou, S., et al. (2009) *Hum Mutat.* 230(3):308-13, и www.goldenhelix.org/A1ATVar).

При использовании в данном документе термин "дефектный аллель *Serpinal*" относится к вариантному аллелю, продуцирующему белки, которые не могут сворачиваться надлежащим образом и могут агрегироваться внутриклеточно и, таким образом, не транспортируются надлежащим образом из участка синтеза в печени в участок действия в организме.

Типичные дефектные аллели *Serpinal* включают в себя "Z-аллель", "S-аллель", "PIM(Malton)-аллель" и "PIM(Procida)-аллель".

При использовании в данном документе термины "Z-аллель", "PIZ" и "Z-AAT" относятся к вариантному аллелю *Serpinal*, в котором аминокислота в положении 342 белка изменяется с глутамина на лизин как результат изменения релевантного кодона с GAG на AAG. Субъект, гомозиготный по Z-аллелю, может быть назван "PIZZ". Мутации Z-AAT встречаются у 95% пациентов с дефектной формой *Serpinal* и по оценкам присутствуют у 100000 американцев и приблизительно 3 миллионов индивидуумов во всем мире. Z-аллель достигает частот полиморфов у представителей европеоидной расы и реже встречается или отсутствует у азиатов и чернокожих. Гомозиготный по ZZ фенотип ассоциирован с высоким риском и эмфиземы, и болезни печени. Белок Z-AAT не сворачивается правильно в эндоплазматическом ретикулуме, что в результате приводит к образованию полимеров "петля-лист", которые агрегируются и снижают секрецию, реакции на несвернутые белки, апоптозу, реакции на перегрузку эндоплазматического ретикулума, аутофагии, митохондриальному стрессу и изменении функции гепатоцитов.

При использовании в данном документе термины "PIM(Malton)" и "M(Malton)-AAT" относятся к вариантному аллелю *Serpinal*, в котором один из соседних фенилаланиновых остатков в положении 51 или 52 зрелого белка удален. Делеция данной одной аминокислоты укорачивает одну нить бета-листа, B6, препятствуя

нормальному процессингу и секреции в печени, что ассоциируется с включениями гепатоцитов и нарушенной секрецией белка из печени.

При использовании в данном документе термин "PIS" относится к вариантному аллелю *Serpinal*, в котором глутаминовая кислота в положении 264 замещена валином. Хотя большая часть этого вариантного белка разрушается внутриклеточно, наблюдается высокая частота аллеля PIS в популяции представителей европеоидной расы, и, таким образом, часто встречаются сложные гетерозиготы с Z-аллелем или нулевым аллелем.

При использовании в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной в процессе транскрипции гена *Serpinal*, в том числе к mRNA, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая характеризуется последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждое из "G", "C", "A" и "U", как правило, означает нуклеотид, который в качестве основания содержит гуанин, цитозин, аденин и урацил, соответственно. "T" и "dT" используют в данном документе взаимозаменяемо, и они относятся к дезоксирибонуклеотиду, где нуклеиновым основанием является тимин, например, дезоксириботимину, 2'-дезокситимидину или тимидину. Однако, будет понятно, что термин "рибонуклеотид", или "нуклеотид", или "дезоксирибонуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, который подробнее описан ниже, или имитирующий нуклеотид заменяющий фрагмент. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без изменения в значительной степени свойств 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 согласно настоящему изобретению нуклеотидами, содержащими, например, инозин. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, являются вариантами осуществления настоящего изобретения.

Термины "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции", используемые взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к средству, которое содержит РНК в том значении, в каком это термин определен в настоящем документе, и которое опосредует целевое расщепление РНК-транскрипта через путь с участием индуцируемого РНК комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфическим к последовательности расщеплением mRNA посредством процесса, известного как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например ингибирует, экспрессию *Serpinal* в клетке, например в клетке субъекта, как, например, субъекта-млекопитающего.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению включает одонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью mRNA *Serpinal*, с направлением расщепления целевой РНК. Не вдаваясь в теорию, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 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 встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой нити направлять распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой mRNA одна или

несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к однокитевой РНК (siRNA), образованной внутри клетки, и которая способствует образованию RISC-комплекса с осуществлением сайленсинга целевого гена, т.е. гена *Serpinal*. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, которая описана выше.

Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi может быть однокитевой siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой mRNA. Однокитевые средства для RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью, из RISC, который затем расщепляет целевую mRNA. Однокитевые siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Строение и исследование однокитевых 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 антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно использовать в качестве однокитевой siRNA, которая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al., (2012) *Cell* 150;:883-894.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к молекулам однокитевого антисмыслового олигонуклеотида, нацеливающимся на *Serpinal*. "Молекула однокитевого антисмыслового олигонуклеотида" является комплементарной последовательности в целевой mRNA (т.е. *Serpinal*). Молекулы однокитевого антисмыслового олигонуклеотида 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. В качестве альтернативы, молекулы однокитевого антисмыслового олигонуклеотида ингибируют целевую mRNA путем гибридизации с мишенью и расщепления мишени посредством явления расщепления с помощью RNaseH. Молекула однокитевого

антисмыслового олигонуклеотида может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов и иметь последовательность, которая комплементарна целевой последовательности. Например, молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида может иметь последовательность, которая включает в себя 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 настоящем документе, например, последовательностей, представленных в любой из таблиц 1, 2, 5, 7, 8 или 9 или связывающихся с любым из целевых участков, описанных в настоящем документе. Молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида могут включать в себя модифицированную РНК, ДНК или их комбинацию.

Согласно другому варианту осуществления "iRNA" для применения в композициях, применениях и способах согласно настоящему изобретению является двухнитевой РНК, и в настоящем документе ее называют "двухнитевым средством для RNAi", "молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)", "средством на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две встречно-параллельные и, по сути, комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т.е. гену *Serpinal*. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает расщепление целевой РНК, например mRNA, через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

В общем, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая или обе нити могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используется в данном описании, "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими

модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в области техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле типа siRNA, охвачены термином "средство для RNAi" в контексте данных описания и формулы изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, когда две нити являются частью одной большей молекулы и, следовательно, соединены непрерываемой цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединяющую цепь РНК называют петлей "шпилькой". В тех случаях, когда две нити соединены ковалентно способом, отличным от непрерываемой цепи нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединяющую структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований является количеством нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA минус любые выступающие концы, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство для RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступов.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, с целевой последовательностью mRNA *Serpinal1*, направляя расщепление целевой РНК. Без углубления в теорию, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 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 встраиваются в РНК-индуцированный

комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой нити направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой mRNA одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). При использовании в данном документе "нуклеотидный выступ" означает неспаренный нуклеотид или нуклеотиды, которые выпячиваются из дуплексной структуры средства для RNAi, когда 3'-конец одной нити средства для RNAi выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот. "Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухнитевого средства для RNAi нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство для RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухнитевой по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на любом конце молекулы. Средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают средства для RNAi с нуклеотидным выступом на одном конце (т.е. средства с одним выступающим концом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступами на обоих концах.

Термин "антисмысловая нить" означает нить двухнитевого средства для RNAi, включающего участок, который, по сути, комплементарен целевой последовательности (например, mRNA *Serpinal* человека). При использовании в настоящем документе термин "участок, комплементарный части mRNA, кодирующей *Serpinal*" означает участок антисмысловой нити, который, по сути, комплементарен части последовательности mRNA *Serpinal*. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, ошибочное спаривание наиболее допустимо в концевых участках и, если присутствует, как правило, встречается в концевом участке или участках, например, в пределах 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца и/или 3'-конца.

Как показано в нижеприведенных примерах осуществления, неожиданно выявили, что ошибочное спаривание одного нуклеотида

в затравочном участке антисмысловой нити средств для RNAi, раскрытых в настоящем документе, допустимо для всех оснований, за исключением С. "Затравочный участок" представляет собой участок в антисмысловой нити средства для RNAi, отвечающий за распознавание целевой mRNA и соответствующий, например, нуклеотидам 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити. После отжига затравочного участка Argonaute подвергает комплементарные последовательности mRNA из 10 нуклеотидов от 5'-конца встроенной антисмысловой нити нуклеолитическому разрушению, что приводит к расщеплению целевой mRNA. Следовательно, согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства для RNAi согласно настоящему изобретению содержит ошибочное спаривание одного нуклеотида в затравочном участке антисмысловой нити, например, ошибочное спаривание в любом из положений 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити.

Термин "смысловая нить", используемый в данном документе, означает нить dsRNA, которая включает участок, который, по сути, комплементарен участку антисмысловой нити.

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" относится к участку, который расположен вплотную к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом мишени, по которому происходит расщепление. Согласно некоторым вариантам осуществления участок расщепления содержит три основания на любом конце сайта расщепления и расположенных вплотную к нему. Согласно некоторым вариантам осуществления участок расщепления содержит два основания на любом конце сайта расщепления и расположенных вплотную к нему. Согласно некоторым вариантам осуществления сайт расщепления главным образом находится в сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

При применении в данном документе, и если не указано иное, термин "комплементарный" при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной 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 быть жесткими условиями, где жесткие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующим отмыванием. Можно применять другие условия, такие как соответствующие с физиологической точки зрения условия, которые могут встречаться в организме. Например, комплементарная последовательность является удовлетворительной для обеспечения выполнения соответствующей функции нуклеиновой кислоты, например, RNAi. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для анализа комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Последовательности могут быть "полностью комплементарными" по отношению к любой, когда присутствует спаривание оснований нуклеотидов первой нуклеотидной последовательности с нуклеотидами второй нуклеотидной последовательности по всей длине первой и второй нуклеотидных последовательностей. Однако, когда первую последовательность в данном документе характеризуют как "по сути, комплементарную" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными, или в них может иметь место ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации, в то же время сохраняя способность гибридизоваться при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению. Однако, когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько одонитевых выступающих концов, такие выступающие концы не будут считаться ошибочными спариваниями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид с длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид с длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида,

которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

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

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по сути, комплементарный" в данном документе можно использовать по отношению к совпадению оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью dsRNA или между антисмысловой нитью dsRNA и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их использования.

При применении в данном документе полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (mRNA), означает полинуклеотид, который, по сути, комплементарен непрерывной части mRNA, представляющей интерес, (например, mRNA, кодирующей *Serpinal*) в том числе 5'-UTR, открытой рамке считывания (ORF) или 3'-UTR. Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA *Serpinal*, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части mRNA, кодирующей *Serpinal*.

Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией", "подавлением" и другими подобными терминами, и он предусматривает любой уровень ингибирования.

Фраза "ингибирование экспрессии *Serpinal*", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена *Serpinal* (такого как, например, ген *Serpinal* мыши, ген *Serpinal* крысы, ген *Serpinal* обезьяны или ген *Serpinal* человека), а

также вариантов (например, встречающихся в природе вариантов) или мутантов гена *Serpinal*. Таким образом, ген *Serpinal* может быть геном *Serpinal* дикого типа, вариантом гена *Serpinal*, мутантным геном *Serpinal* или трансгенным геном *Serpinal* в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

“Ингибирование экспрессии гена *Serpinal*” предусматривает любой уровень ингибирования гена *Serpinal*, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена *Serpinal*, такую как ингибирование по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Экспрессию гена *Serpinal* можно оценивать, исходя из уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена *Serpinal*, например, уровня mRNA *Serpinal*, уровня белка *Serpinal* или уровней сывороточного ААТ. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например,

исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

Фраза "приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi", используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi предусматривает приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vitro* или приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для RNAi можно приводить в физический контакт с клеткой путем отдельного осуществления способа или, в качестве альтернативы, средство для RNAi можно поместить в обстановку, которая позволит средству прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством для RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем введения инъекцией средства для RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем введения инъекцией средства для RNAi в другую область, кровоток или подкожное пространство так, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт со средством. Например, средство для RNAi может содержать лиганд и/или может быть связано с ним, например, лигандом, представляющим собой GalNAc3, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, к печени. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. По отношению к способам согласно настоящему изобретению клетку также можно приводить в контакт со средством для RNAi *in vitro* и в дальнейшем пересаживать субъекту.

Термины "пациент" или "субъект", используемые в данном документе, подразумевают как включающие либо человека, либо

животное, отличное от человека, предпочтительно млекопитающее, например, обезьяну. Наиболее предпочтительно, субъектом или пациентом является человек.

“Ассоциированное с Serpinal заболевание” при применении в данном документе подразумевают как включающее любое заболевание, ассоциированное с геном или белком Serpinal. Такое заболевание может быть вызвано, например, неправильным сворачиванием белка Serpinal, внутриклеточным накоплением белка Serpinal (например, неправильно свернутого белка Serpinal), избыточным продуцированием белка Serpinal, вариантами гена Serpinal, мутациями гена Serpinal, аномальным расщеплением белка Serpinal, аномальными взаимодействиями Serpinal с другими белками или другими эндогенными или экзогенными веществами. Ассоциированным с Serpinal заболеванием может быть болезнь печени и/или болезнь легких.

“Болезнь печени” при использовании в настоящем документе предусматривает заболевание, нарушение или состояние, влияющее на печень и/или ее функцию. Нарушение печени может быть результатом накопления белка Serpinal в печени и/или клетках печени. Примеры нарушений печени включают в себя нарушения печени, вызванные вирусными инфекциями, паразитарными инфекциями, генетической предрасположенностью, аутоиммунными заболеваниями, воздействием радиации, воздействием токсических для печени соединений, механическим повреждением, различными токсинами окружающей среды, спиртом, ацетаминофеном, комбинацией спирта и ацетаминофена, ингаляционными анестетиками, ниацином, химиотерапевтическими средствами, антибиотиками, анальгетиками, противорвотными средствами, растительной добавкой кава и их комбинациями.

Например, нарушение печени, ассоциированное с дефектной формой Serpinal, чаще может возникать у субъектов с одной или несколькими копиями некоторых аллелей (например, аллелей PIZ, PiM(Malton) и/или PIS). Не углубляясь в теорию, полагают, что аллели, ассоциированные с повышенным риском развития болезни печени, связанной с альфа-1 антитрипсином, кодируют формы Serpinal, которые подвергаются неправильному сворачиванию и не

выделяются надлежащим образом из гепатоцитов. Клеточные реакции на такие неправильно свернутые белки могут включать в себя реакцию на несвернутые белки (UPR), ассоциированное с эндоплазматическим ретикулулом расщепление (ERAD), апоптоз, реакцию на перегрузку эндоплазматического ретикулума, аутофагию, митохондриальный стресс и изменение функции гепатоцитов. Повреждения гепатоцитов могут приводить к таким симптомам, как без ограничения воспаление, холестаз, фиброз, цирроз, длительная обтурационная желтуха, повышенные уровни трансаминаз, портальная гипертензия и/или печеночноклеточная карцинома. Без углубления в теорию, высоко варьируемое клиническое течение данного заболевания предполагает модификаторы или "вторичные факторы" как причины развития симптомов или прогрессирование тяжести.

Например, субъекты с PIZ-аллелем могут быть более восприимчивыми к инфекциям гепатита С или алкогольной зависимости, и у них с большей вероятностью может развиваться нарушение печени при воздействии этих факторов. Кроме того, субъекты с кистозным фиброзом (CF), несущие PIZ-аллель, подвержены большему риску развития тяжелой болезни печени с портальной гипертензией. Дефектная форма *Serpina1* также может обуславливать развитие эмфиземы с ранним началом, некротического панникулита, бронхоэктаза и/или длительной желтухи новорожденных или способствовать этому. Некоторых пациентов с недостаточностью альфа-1-антитрипсина или подвергающихся риску таковой, выявляют путем скрининга, если в их семьях есть пораженные недостаточностью альфа-1-антитрипсина.

Типичные нарушения печени включают в себя без ограничения воспаление печени, хроническую болезнь печени, цирроз, фиброз печени, печеночноклеточную карциному, некроз печени, стеатоз, холестаз, и/или снижение, и/или потерю функции гепатоцитов.

"Цирроз" представляет собой патологическое состояние, ассоциированное с хроническим поражением печени, которое включает в себя обширный фиброз и регенеративные узлы в печени.

"Фиброз" представляет собой пролиферацию фибробластов и

образование рубцовой ткани в печени.

Фраза "функция печени" относится к одной или нескольким из многочисленных физиологических функций, выполняемых печенью. Такие функции включают в себя без ограничения регуляцию уровней сахара в крови, эндокринную регуляцию, ферментные системы, взаимопревращение метаболитов (например, кетоновых тел, стерина, стероидов и аминокислот); продуцирование белков крови, таких как фибриноген, сывороточный альбумин и холинэстераза, эритропоэтическая функция, детоксификация, образование желчи и хранение витаминов. В уровне техники известны некоторые тесты для проверки функции печени, в том числе, например, измерение уровня аланинаминотрансферазы (ALT), щелочной фосфатазы, билирубина, протромбина и альбумина.

"Терапевтически эффективное количество" при применении в данном документе подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении пациенту для лечения Serpinal-ассоциированного заболевания достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией Serpinal, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество" при применении в данном документе подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы Serpinal-ассоциированного заболевания, но у которого может иметься предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление заболевания

включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включают количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства для RNAi, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Термин "образец", используемый в данном документе, включает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекте. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, мочу, лимфу, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, слюну и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. Согласно определенным вариантам осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток печени, таких как, например, гепатоциты). Согласно предпочтительным вариантам осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму, полученные от субъекта. Согласно дополнительным вариантам осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени (или ее составляющих), полученную от субъекта.

II. iRNA согласно настоящему изобретению

В настоящем документе описываются улучшенные двухнитевые средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена *Serpinal* в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, такого как человек с ассоциированным с *Serpinal* заболеванием, например, болезнью печени, например, хронической болезнью печени, воспалением печени, циррозом, фиброзом печени и/или печеночноклеточной карциномой.

Следовательно, настоящее изобретение относится к двухнитевым средствам для RNAi с химическими модификациями, способным ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена *Serpinal*) *in vivo*. В некоторых аспектах настоящего изобретения практически все нуклеотиды iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды в iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными. iRNA согласно настоящему изобретению, в которой "практически все нуклеотиды являются модифицированными", является в значительной степени, но не полностью, модифицированной и может включать в себя не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Каждая нить средства для RNAi в длину может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая нить может составлять в длину 14-30 нуклеотидов, 17-30 нуклеотидов, 19-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство для RNAi." Дуплексный участок средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, дуплексный участок может составлять 14-30 пар нуклеотидов в длину, 17-30 пар нуклеотидов в длину, 27-30 пар нуклеотидов в длину, 17-23 пары нуклеотидов в длину, 17-21 пару

нуклеотидов в длину, 17-19 пар нуклеотидов в длину, 19-25 пар нуклеотидов в длину, 19-23 пары нуклеотидов в длину, 19-21 пару нуклеотидов в длину, 21-25 пар нуклеотидов в длину или 21-23 пары нуклеотидов в длину. В другом примере дуплексный участок выбран из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Выступающий конец может составлять в длину 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. Выступающие концы могут быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или того, что две нити одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Выступающий конец может осуществлять ошибочное спаривание с целевой mRNA или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других линкеров, не являющихся основаниями.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства для RNAi независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том числе, без ограничения, с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2-F, 2'-O-метил, тимидин (T), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Teo), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Aeo), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, TT может быть выступающей последовательностью для любого конца на любой нити. Выступающий конец может осуществлять ошибочное спаривание с целевой mRNA или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для RNAi могут быть

фосфорилированными. Согласно некоторым вариантам осуществления выступающий(ие) участок(и) содержит(содержат) два нуклеотида с фосфотриоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. Согласно одному варианту осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. Согласно одному варианту осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

Средство для RNAi может содержать только один выступающий конец, который может усиливать интерферирующую активность средства для RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, одонитевой выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или *vice versa*. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Без углубления в теорию, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в RISC-процесс.

Любая из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем изобретении, может быть синтезирована и/или модифицирована способами, хорошо известными в уровне техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен тем самым в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают в себя, например, концевые модификации, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгирование, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгирование, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.п.); модификации оснований, например, замещение стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые спариваются с расширенным

репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенные азотистого основания нуклеотиды) или конъюгированных оснований; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замещение сахара; и/или модификации скелета, в том числе модификацию или замещение фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений iRNA, применимых в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают в себя без ограничения РНК, содержащие модифицированные скелеты или отличные от природных межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными скелетами включают в себя, среди прочих, такие, которые не содержат атом фосфора в скелете. Применительно к настоящему описанию, и как иногда упоминается в уровне техники, модифицированные РНК, не имеющие атома фосфора в своем межнуклеозидном скелете, также могут считаться олигонуклеозидами. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные iRNA будут иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном скелете.

Скелеты модифицированной РНК включают в себя, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфодитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокислотфосфотриэфиры, метил- и другой алкил-фосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминокислотфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и борофосфаты с нормальными 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 вышеупомянутых содержащих фосфор связей, включают в себя 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 патентный документ США RE39464, полное содержание каждого из которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки.

Скелеты модифицированных РНК, которые не имеют атома фосфора в своем составе, включают в себя скелеты, 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 в себя скелеты с морфолиновыми связями (образованные частично из части нуклеозида, представляющей собой сахар); силоксановые скелеты; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые скелеты; формацетильные и тиоформацетильные скелеты; метиленформацетильные и тиоформацетильные скелеты; содержащие алкен скелеты; сульфаматные скелеты; метилениминовые и метиленигидразиновые скелеты; сульфонатные и сульфонамидные скелеты; амидные скелеты и другие, содержащие части смешанных компонентов N, O, S и CH₂.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение вышеупомянутых олигонуклеозидов включают в себя 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, полное содержание каждого из которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другим вариантам осуществления приемлемые миметики РНК предполагаются для применения в iRNA, в которых и сахар, и межнуклеозидная связь, т.е. скелет, нуклеотидных единиц замещены новыми группами. Единицы оснований сохраняются для гибридизации с соответствующими целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает отличными свойствами

гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный скелет РНК замещается содержащим амид скелетом, в частности, аминоэтилглициновым скелетом. Нуклеотидные основания сохраняются и соединяются непосредственно или опосредованно с атомами азота в амидной части скелета. Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение соединений PNA, включают в себя без ограничения патенты США № 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, приемлемые для применения в iRNA согласно настоящему изобретению, описываются, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, включают в себя РНК с фосфоротиоатными скелетами и олигонуклеозиды со скелетами с гетероатомами и, в частности, --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [известный как метилен (метиимино) или MMI скелет], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- и --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [где нативный скелет сложного фосфодиэфира представлен как --O--P--O--CH₂--] вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные скелеты вышеупомянутого патента США № 5602240. Согласно некоторым вариантам осуществления РНК, описанные в настоящем документе, имеют структуры морфолинового скелета согласно вышеупомянутому патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных фрагментов, представляющих собой сахара. iRNA, например, dsRNA, описанные в настоящем документе, могут включать в 2'-положении одно из следующих: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C₁-C₁₀алкилом или C₂-C₁₀алкенилом и алкинилом. Типичные приемлемые модификации включают в себя O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10. Согласно другим вариантам осуществления

dsRNA включают в 2'-положении одно из следующих: низший C₁-C₁₀алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, О-алкарил или О-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоксиламино, 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 в себя 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т.е. алкокси-алкоксигруппу. Другой типичной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах в настоящем документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известный в уровне техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

Другие модификации включают в себя 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК 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 пентофуразозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение таких структур с модифицированными сахарами, включают в себя 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. Полное содержание каждого из вышеупомянутых тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

iRNA также может включать в себя модификации и замещения нуклеотидного основания (часто называемого в уровне техники

просто "основанием"). При использовании в данном документе "немодифицированные" или "натуральные" нуклеотидные основания включают в себя пуриновые основания - аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания - тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают в себя другие синтетические и натуральные нуклеотидные основания, такие как дезокси-тимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 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-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности, 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают в себя раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в *Modified 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 применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных в настоящем изобретении. Они включают в себя 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 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 являются типичными замещениями оснований, еще более конкретно при комбинировании с 2'-О-метоксиэтильными модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение некоторых из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают в себя без ограничения вышеупомянутые патенты США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088, полное содержание которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

РНК iRNA также может быть модифицирована таким образом, что включает одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид с модифицированным рибозным фрагментом, в котором рибозный фрагмент содержит дополнительные мостиковые соединяющие 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 и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc 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 и 7399845, полное содержание каждого из которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать в себя N-(ацетиламинокапроил)-4-

гидроксипролинол (Нур-С6-ННас), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННас), тимидин-2'-0-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноил-уридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Раскрытие такой модификации можно найти в РСТ публикации № WO 2011/005861.

А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы согласно настоящему изобретению

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают в себя средства с химическими модификациями, как раскрывается, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в РСТ/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Как показано в данном документе и в предварительной заявке № 61/561710, превосходные результаты могут быть получены путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить средства для RNAi, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. Согласно некоторым вариантам осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для RNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство для RNAi, к примеру смысловая нить, может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNac. Полученные в результате средства для RNAi характеризуются превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого средства для RNAi модифицированы так, что содержат один или несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления по меньшей мере одной нити средства для RNAi или рядом с ним, активность

средства для RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, составляющий 19 нуклеотидов в длину, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, составляющий 20 нуклеотидов в длину, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, составляющий 21 нуклеотид в длину, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находятся на 3'-конце

антисмысловой нити. В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находятся на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi дополнительно содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. Согласно одному варианту осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-O-метилом или 3'-фтором, например, при чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc3).

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для RNAi содержит первую нить с длиной, которая составляет по меньшей мере 25 и самое большее 29 нуклеотидов, и вторую нить с длиной, которая составляет самое большее 30 нуклеотидов, по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где дуплексный участок составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, а вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, для снижения экспрессии целевого гена, где средство для RNAi вводят в клетки млекопитающего, и где расщепление средства для RNAi при помощи дайсера предпочтительно дает в результате siRNA, содержащую 3'-конец второй нити, снижая, таким образом, экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно, средство для RNAi дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства для RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити или рядом с ним.

Для средства для RNAi с дуплексным участком, составляющим 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой нити находится обычно около 10, 11 и 12 положений от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка RNAi от 5'-конца.

Смысловая нить средства для RNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может характеризоваться по меньшей мере одним мотивом из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити или рядом с ним. В тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплекс dsRNA, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выравнены так, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида могут

перекрываться, или все три нуклеотида могут перекрываться.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланкирующей модификацией. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, тогда химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, когда присутствует две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может находиться на одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в сайте расщепления или рядом с ним или с обеих сторон ведущего мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Данная антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

Согласно другому варианту осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два

спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В тех случаях, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

В тех случаях, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выравнены так, что две модификации, каждая от одной нити, попадает на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадает на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обе стороны от ведущего мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

Согласно одному варианту осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, могут быть модифицированными. Каждый нуклеотид может быть модифицированным одной и той же или разными модификациями, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных атомов кислорода фосфата и/или одного или нескольких связанных атомов кислорода фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полное замещение фосфатного фрагмента на "дефосфоризованные" линкеры; модификацию или замещение встречающегося в природе основания и замещение или модификацию рибознофосфатного скелета.

Поскольку нуклеиновые кислоты являются полимерами из субъединиц, то многие из модификаций встречаются в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или

несвязанного О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера, модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в двухнитевом участке, в одонитевом участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухнитевом участке РНК или может встречаться только в одонитевом участке РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в несвязанном положении О может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в двухнитевом и одонитевом участках, в частности на конце. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это может быть возможно, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или нуклеотидных заместителей в одонитевые выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированными, например, при помощи модификаций, описанных в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара при помощи модификаций, которые известны в данной области, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезокси-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных, вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификации фосфатной группы, например, фосфоротиоатной модификации. Выступающие концы могут не быть гомологичными с целевой последовательностью.

Согласно одному варианту осуществления каждый остаток

смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксидом, 2'-гидроксидом или 2'-фтором. Нити могут содержать несколько модификаций. Согласно одному варианту осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой нити и антисмысловой нити. Эти две модификации могут быть 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями или другими.

Согласно одному варианту осуществления N_a и/или N_b имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", используемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один через каждые два нуклеотида, или один через каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "ABABABABAB...", "AABBAABBAABV...", "AABAABAABAAB...", "AAABAABAABAAB...", "AAABVBAABV..." или "ABCABCABCABC..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одним и тем же или разным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." или "CDCDCD..." и т.д.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловой нити, сдвинутый относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной

другим способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и *vice versa*. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в дуплексе dsRNA чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью присутствует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi первоначально содержит паттерн чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити и первоначально имеет сдвиг в отношении паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой нити, т.е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловой нити с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой нити и *vice versa*. 1 положение в смысловой нити может начинаться с 2'-F-модификации, а 1 положение в антисмысловой нити может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает первоначальный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити и/или антисмысловой нити. Такое нарушение паттерна модификаций смысловой и/или антисмысловой нити путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую и/или антисмысловую нить неожиданно повышает активность относительно сайленсинга генов в отношении целевого гена.

Согласно одному варианту осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является

модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N_aYYYN_b...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, а "N_a" и "N_b" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "YYY", которая отличается от модификации Y, и где N_a и N_b могут быть одинаковыми или различными модификациями. В качестве альтернативы, N_a и/или N_b могут присутствовать или отсутствовать, когда присутствует фланкирующая модификация.

Средство для RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфоротиаотную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиаотной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити, или антисмысловой нити, или обеих нитей в любом положении в нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловой нити и/или антисмысловой нити; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне в смысловой нити и/или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой нити может характеризоваться сдвигом относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления RNAi имеет модификацию фосфоротиаотной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфоротиаотной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие

нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут находиться между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Эти три концевые нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления выступ из 2 нуклеотидов находятся на 3'-конце антисмысловой нити, и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство для RNAi может дополнительно иметь две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления в средстве для RNAi имеет (имеют) место ошибочное (ые) спаривание (я) с мишенью в дуплексе либо их комбинации. "Ошибочным спариванием" может быть неканоническое спаривание оснований или отличное от канонического спаривание нуклеотидов. Ошибочное спаривание может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать, исходя из их склонности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, наиболее простым подходом является изучение пар по отдельным парам оснований, хотя можно также выполнить анализ следующей соседней пары или подобный). В плане содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна,

чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например неканонические или отличные от канонических типы спаривания (которые описаны в других частях данного документа), более предпочтительны, чем канонические типы спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальные основания, более предпочтительны, чем канонические типы спаривания. "Универсальное основание" представляет собой основание, которое проявляет способность к замещению любого из четырех нормальных оснований (G, C, A и U) без существенных дестабилизирующих взаимодействий соседних пар оснований или нарушения предполагаемой функциональной биохимической применимости модифицированного олигонуклеотида. Неограничивающие примеры универсальных оснований включают в себя 2'-дезоксиинозин (гипоксантиндезоксинуклеотид) или их производные, нитроазольные аналоги и гидрофобные ароматические основания без водородных связей.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, с неканоническим или отличным от канонического типами спаривания или типами спаривания, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотид в 1 положении в дуплексном участке от 5'-конца в антисмысловой нити выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити является парой оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити является парой оснований AU.

Согласно другому варианту осуществления нуклеотидом на 3'-конце смысловой нити является дезокситимин (dT). Согласно другому варианту осуществления нуклеотидом на 3'-конце антисмысловой нити является дезокситимин (dT). Согласно одному

варианту осуществления имеется короткая последовательность дезокситиминовых нуклеотидов, например, два dT нуклеотида на 3'-конце смысловой и/или антисмысловой нити.

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

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

где

каждый из i и j независимо равняется 0 или 1;

каждый из p и q независимо равняется 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

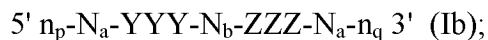
где N_b и Y имеют не одинаковую модификацию; и

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

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 дуплексный участок, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или вблизи него (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 i равняется 1, а j равняется 0, или i равняется 0, а j равняется 1, или как i , так и j равняются 1. Смысловая нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



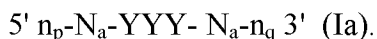
В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15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

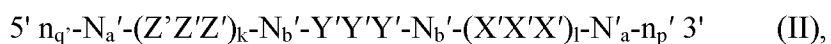
Каждый из X, Y и Z может быть таким же, как остальные, или отличным от них.

Согласно другим вариантам осуществления i равняется 0, а j равняется 0, и смысловая нить может быть представлена формулой



В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ia), каждый 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):



где

каждый из k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p' и q' независимо равняется 0-6;

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

каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

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

где N_b' и Y' имеют не одинаковую 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' имеет модификации чередующегося паттерна.

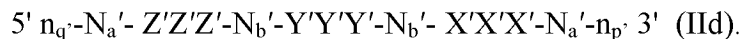
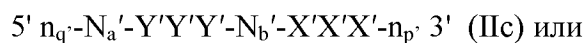
Мотив $Y'Y'Y'$ находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив $Y'Y'Y'$ может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой 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'-ОМе-модифицированы.

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

и 1 равняются 1.

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

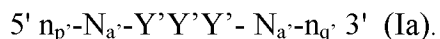


В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

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

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена как формула (IIId), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый 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



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

Каждый из X' , Y' и Z' может быть таким же, как остальные,

или отличным от них.

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

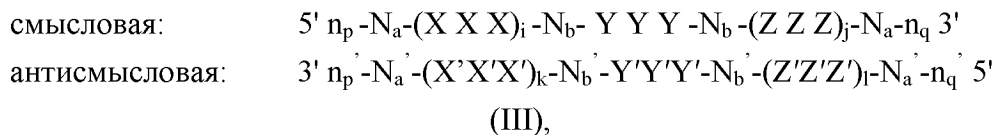
В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в 9, 10 и 11 положениях нити, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1^{го} 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.

В одном варианте 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'-O-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'-OMe-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 от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс для RNAi, представлен формулой (III):



где

каждый из i , j , k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p , p' , q и q' независимо равняется 0–6;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0–25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0–10 модифицированных нуклеотидов;

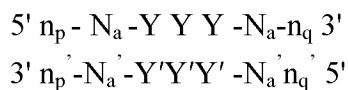
где

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

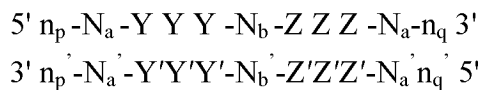
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

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

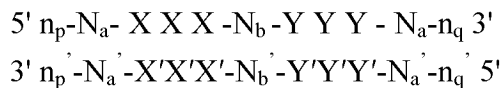
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



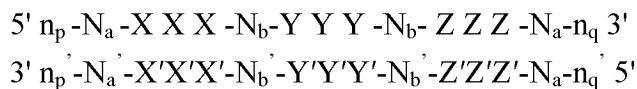
(IIIa),



(IIIb),



(IIIc),



(IIIId).

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждый 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), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый 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 как формула (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый 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 как формула (IIIId), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо имеет модификации с чередующимся паттерном.

Каждый из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId) может быть таким же, как остальные, или отличным от них.

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'. В качестве альтернативы, 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'. В качестве альтернативы, 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 как формула (IIIc) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы, 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', модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z', и/или модификация 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' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфототиоатной 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' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфототиоатной 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' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфототиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфототиоатную 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 (IIIa), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфототиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфототиоатную 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.

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки.

Средство для RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства, представляющего собой dsRNA, можно замещать другими фрагментами, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был замещен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией-замещением рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой

системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т.е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может быть полностью насыщенной кольцевой системой, или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к скелету", предпочтительно две "точки присоединения к скелету" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Выражение "точка присоединения к скелету", используемое в данном документе, означает функциональную группу, например, гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную для введения носителя в скелет и которая подходит для этого, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серосодержащий скелет рибонуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (TAP) согласно некоторым вариантам осуществления означает входящий в кольцо атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный от атома, который обеспечивает точку присоединения к скелету), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть, например, углеводом, например, моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно, выбранный фрагмент соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, которая подходит для введения или связывания другого химического структурного элемента, например лиганда, с составным кольцом.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила,

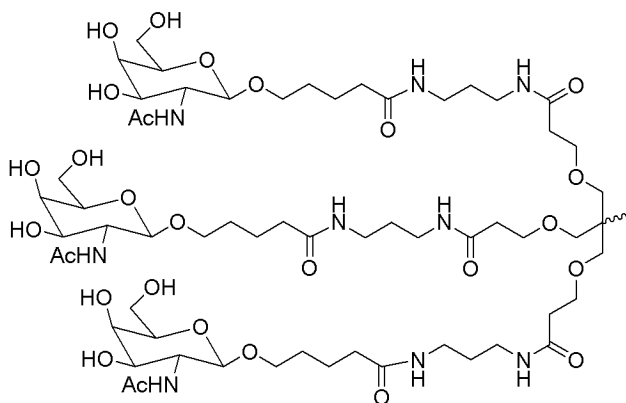
имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из скелета, представляющего собой серинол, или скелета, представляющего собой диэтанолламин.

Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления средство для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из таблиц 1, 2, 5 и 7.

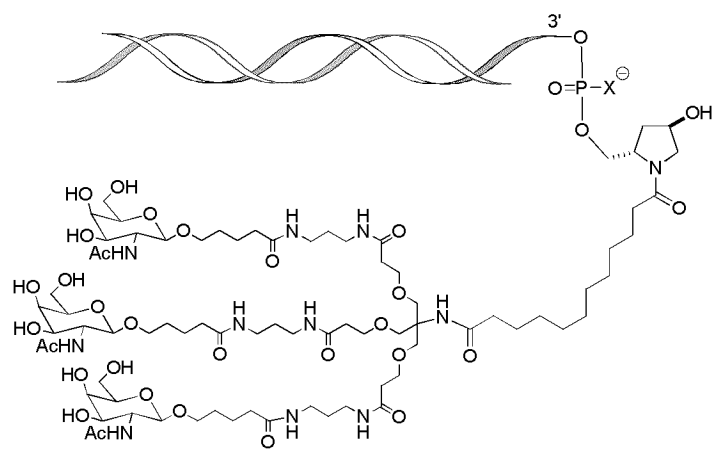
Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

Лиганды

Средства, представляющие собой двухнитевую РНК (dsRNA), согласно настоящему изобретению необязательно могут быть конъюгированы с одним или несколькими лигандами. Лиганд может быть присоединен к смысловой нити, антисмысловой нити или обеим нитям на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах. К примеру, лиганд может быть конъюгирован со смысловой нитью. Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления лиганд является лигандом, представляющим собой GalNAc. В особенно предпочтительных вариантах осуществления лиганд представляет собой GalNAc₃:



В некоторых вариантах осуществления лиганд, например лиганд, представляющий собой GalNAc, присоединен к 3'-концу средства для RNAi. Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, например лигандом, представляющим собой GalNAc, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S. Согласно одному варианту осуществления X представляет собой O.

Широкий спектр структурных элементов может быть соединен со средствами для RNAi согласно настоящему изобретению. Предпочтительными фрагментами являются лиганды, которые соединены, предпочтительно ковалентно, либо непосредственно, либо опосредованно через промежуточный связывающий фрагмент.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования молекулы, в которую он введен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Лиганды, обеспечивающие повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающие лиганды.

Некоторые лиганды могут иметь эндосомолитические свойства. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который проявляет pH-зависимую мембранную активность и фузогенность. Согласно одному варианту осуществления эндосомолитический лиганд принимает активную конформацию при эндосомальном pH. "Активная" конформация

является такой конформацией, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao *et al.*, *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), пептид EALA (Vogel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) и их производные (Turk *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). Согласно одному варианту осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая будет претерпевать изменения в заряде или протонировании в ответ на изменения pH. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

Лиганды могут улучшать транспортировку, гибридизацию и свойства специфичности и могут также улучшать устойчивость к нуклеазам полученных естественных или модифицированных олигонуклеотида или полимерной молекулы, содержащих любую комбинацию мономеров, описанных в данном документе, и/или естественных или модифицированных рибонуклеотидов.

Лиганды, как правило, могут включать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или "репортерные" группы, например, для отслеживания распределения; сшивающие средства и придающие устойчивость к нуклеазам фрагменты. Общие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

Лиганды могут включать вещество, встречающееся в природе, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой

полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)меакриламидный сополимер (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), 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 липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также включают нацеливающие группы, например, нацеливающее на клетку или ткань средство, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как клетка почки. Нацеливающей группой могут быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспаратат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, биотин, RGD-пептид, миметик RGD-пептида или аптамер.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (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)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминокислоты, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]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, HRP 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 клеточным типом, 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, поливалентную фукозу или аптамеры. Лигандом, например, может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

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

Лиганд может увеличивать поглощение олигонуклеотида клеткой, например, путем активации воспалительной реакции. Иллюстративные лиганды, которые будут обладать таким действием, включают фактор некроза опухолей альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1-бета или гамма интерферон.

В одном аспекте лиганд является липидом или липидной молекулой. Такие липиды или липидные молекулы предпочтительно связываются с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином 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 использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или липидный лиганд может (a) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (c) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Липидный лиганд можно применять для модулирования, например, регулирования 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 выводиться из организма. Липид или липидный лиганд, которые связываются с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления липидный лиганд связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в ткани, отличной от ткани почек. Однако, предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В другом предпочтительном варианте осуществления липидный лиганд связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почке. Другие фрагменты, которые нацелены на клетки почек, также можно использовать вместо или в дополнение к липидным лигандам.

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например,

пролиферирующей клеткой. Таковые являются особенно пригодными для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HAS, липопротеин низкой плотности (LDL) и липопротеин высокой плотности (HDL).

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство для проникновения в клетку. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopodia. Если средством является пептид, то он может быть модифицированным, включая пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральным средством предпочтительно является альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется 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 естественному пептиду. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять приблизительно 5-50 аминокислот в длину, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tyr, Trp или Phe). Фрагментом, представляющим собой пептид, может быть пептид-дендример, стерически затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте фрагмент, представляющий собой пептид, может включать

гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративный содержащий гидрофобную MTS пептид является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:29). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:30)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Фрагмент, представляющий собой пептид, может быть "доставляющим" пептидом, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, последовательности белка Tat HIV (GRKKRRQRRPPQ; SEQ ID NO:31) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK; SEQ ID NO:32), как было обнаружено, способны функционировать как доставляющие пептиды. 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). Предпочтительно, пептид или пептидомиметик, связанный со средством на основе iRNA 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 пределах от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, такой как для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже. Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно использовать для нацеливания на 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 способствовать нацеливанию средства на основе iRNA на опухоли ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8:783-

787, 2001). Предпочтительно RGD-пептид будет способствовать нацеливанию средства на основе iRNA на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например гликозилированным или метилированным, для способствования нацеливанию на специфические ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство на основе iRNA к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha\beta_3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Можно использовать пептиды, которые нацелены на маркеры, которыми обогащены пролифилирующие клетки. Например, содержащие RGD пептиды и пептидомиметики могут быть нацелены на раковые клетки, в частности, клетки, на поверхности которых присутствует интегрин. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно использовать другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для контроля пролификации клеток и ангиогенеза. Предпочтительные конъюгаты с таким типом лиганда нацелены на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например, раковый ген, описанный в данном документе.

“Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку” способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, например, может быть α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например, α -дефенсин, β -дефенсин 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).

Согласно одному варианту осуществления нацеливающим пептидом может быть амфипатический α -спиральный пептид. Иллюстративные амфипатические α -спиральные пептиды включают, без ограничений, цекропины, ликотоксины, парадаксины, буфорин, CRF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревинины-2, дермасептины, меллитины, плеуроцидины, пептиды H₂A, пептиды *Xenopus*, эскулентины-1 и цаерины. Некоторое количество факторов предпочтительно будет рассматриваться для поддержания целостности стабильности спирали. Например, будут использовать максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и будут использовать минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролин или циклические мономерные единицы). Будет рассматриваться кэппирующий остаток (например, Gly, представляющий собой иллюстративный N-кэппирующий остаток), и/или будет использоваться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной N-связи для стабилизации спирали. Образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными $i \pm 3$ или $i \pm 4$ положениями, может обеспечивать стабильность. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками, глутаматом или аспаратом.

Лиганды, представляющие собой пептиды и пептидомиметики, включают те пептиды, которые имеют природное происхождение или модифицированы, например, D- или L-пептиды; α -, β - или γ -пептиды; пептиды с N-метилом; азапептиды; пептиды с одним или несколькими амидами, т.е. пептиды со связями, замещенными одним или несколькими из мочевины, тиомочевины, карбамата или связями сульфонилмочевины; или циклические пептиды.

Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, который способен нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P,

кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер или аптамер. Кластер является комбинацией двух или более единиц сахара. Нацеливающие лиганды также включают лиганды интегринового рецептора, лиганды для хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCPII, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Лиганды также могут основываться на нуклеиновой кислоте, например, аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или может иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

Эндосомальные высвобождающие средства включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, полиакатионы, скрытые олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэфиры, полимеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами, дендримеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами.

РК-модулятор означает фармакокинетический модулятор. РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкил-глицериды, диацил-глицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотрифосфатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотрифосфатных связей в скелете, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов).

Кроме того, аптамеры, которые связываются с сывороточными компонентами (например, сывороточными белками) также пригодны в настоящем изобретении в качестве РК-модулирующих лигандов.

Другие конъюгаты, представляющие собой лиганды, пригодные

в настоящем изобретении, описаны в заявках на патент США USSN: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833934, поданной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г., и USSN: 11/944227, поданной 21 ноября 2007 г., которые включены при помощи ссылки в полном объеме для всех целей.

В тех случаях, когда присутствуют два или более лиганда, все лиганды могут обладать одинаковыми свойствами, могут обладать различными свойствами, или некоторые лиганды обладают одинаковыми свойствами, в то время как другие обладают различными свойствами. Например, лиганд может обладать нацеливающими свойствами, обладать эндосомолитической активностью или обладать РК-модулирующими свойствами. В предпочтительном варианте осуществления все лиганды обладают различными свойствами.

Лиганды могут быть соединены с олигонуклеотидами в разных местах, например, на 3'-конце, 5'-конце и/или во внутреннем положении. Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд присоединен к олигонуклеотидам посредством промежуточного связывающего фрагмента, например, носителя, описанного в данном документе. Лиганд или связанный лиганд могут присутствовать на мономере в тех случаях, когда мономер введен в растущую нить. Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть введен посредством связывания с мономером-"предшественником" после того, как мономер-"предшественник" был введен в растущую нить. К примеру, мономер, например, с амино-концевым связывающим фрагментом (т.е. без ассоциированного лиганда), например $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, может быть введен в растущую олигонуклеотидную нить. На последующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с электрофильной группой, например группой сложного пентафторфенилового эфира или альдегидной группой, впоследствии может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связывающего фрагмента мономера-предшественника.

В другом примере может быть введен мономер с химической группой, пригодной для участия в реакциях клик-химии, например, связывающий фрагмент/линкер с азидом или алкином на конце. На последующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с комплементарной химической группой, например алкин или азид, может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания алкина и азидов вместе.

Что касается двухнитевых олигонуклеотидов, то лиганды могут быть присоединены к одной или обоим нитям. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе двухнитевой iRNA содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью. Согласно другим вариантам осуществления средство на основе двухнитевой iRNA содержит лиганд, конъюгированный с антисмысловой нитью.

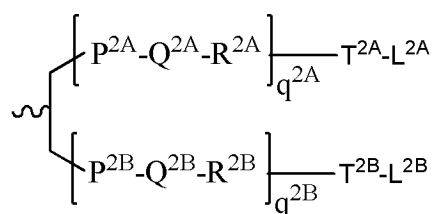
Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеосооснованиями, фрагментами, представляющими собой сахара, или межнуклеозидными связями молекул нуклеиновых кислот. Конъюгация с пуриновыми нуклеосооснованиями или их производными может происходить в любом положении, в том числе внутрикольцевых и внекольцевых атомов. Согласно некоторым вариантам осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеосооснования присоединены к фрагменту конъюгата. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеосооснованиями или их производными также может происходить в любом положении. Согласно некоторым вариантам осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового основания могут быть замещены фрагментом конъюгата. Конъюгация с фрагментами, представляющими собой сахара, нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода фрагмента, представляющего собой сахар, который может быть присоединен к фрагменту конъюгата, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. 1' положение также может быть присоединено к фрагменту конъюгата, как, например, в абазическом остатке. Межнуклеозидные связи также могут нести фрагменты конъюгата. Что касается фосфоросодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфотриоатной, фосфодитиоатной,

фосфорамидатной и т.п.), то фрагмент конъюгата может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеотидных связей (например, PNA), фрагмент конъюгата может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

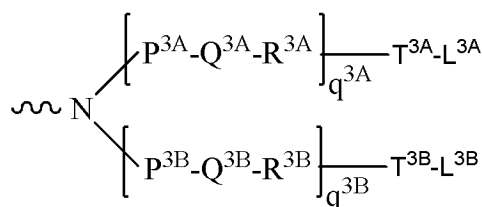
Можно применять любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд, хотя лиганд, как правило, представляет собой углевод, например, моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

Линкеры, посредством которых лиганд конъюгирует с нуклеиновой кислотой, включают те, которые описаны выше. Например, лигандом может быть одно или несколько производных GalNAc (*N*-ацетилглюкозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные любой из формул (IV) – (VII):

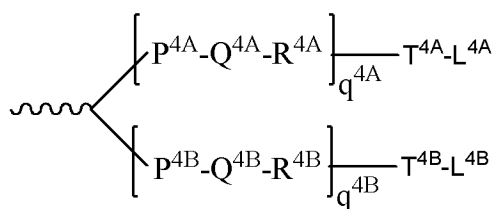


Формула (IV)

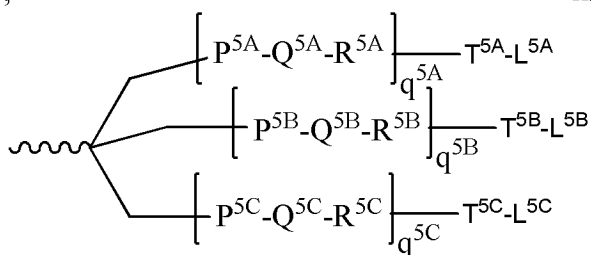


Формула (V)

или;



Формула (VI)



Формула (VII)

где

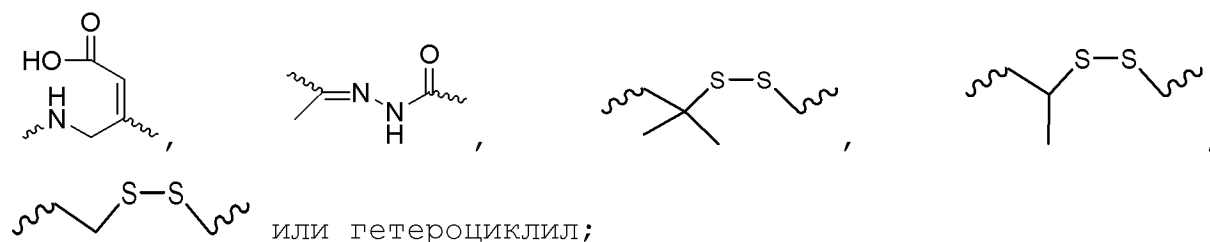
q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо представляют собой для каждого случая 0–20, и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый 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, переставляет собой CO , NH , O , S , $OC(O)$, $NHC(O)$, CH_2 , CH_2NH или CH_2O ;

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 оканчиваться одним или несколькими из O , S , $S(O)$, SO_2 , $N(R^N)$, $C(R')=C(R'')$, $C\equiv C$ или $C(O)$;

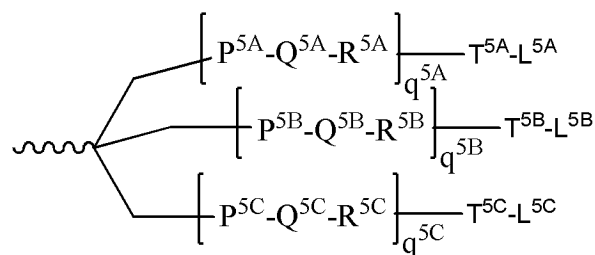
каждый из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH , O , S , CH_2 , $C(O)O$, $C(O)NH$, $NHCH(R^a)C(O)$, $-C(O)-CH(R^a)-NH-$, CO , $CH=N-O$,



L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; т.е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и

R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

Для применения со средством для RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена особенно пригодны трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc, такие как производные формулы (VII):

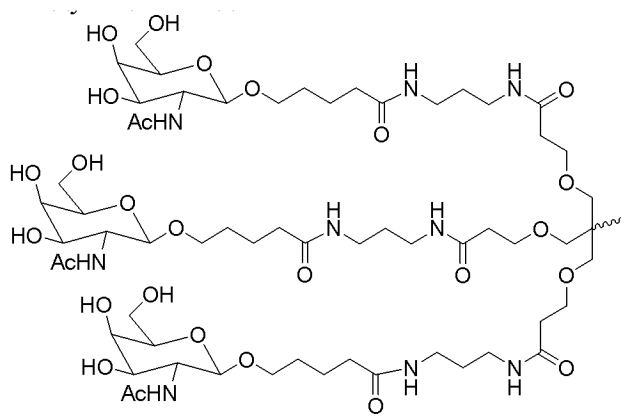


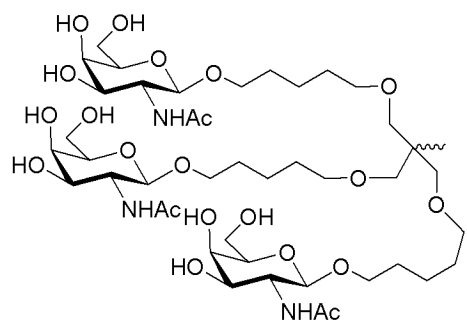
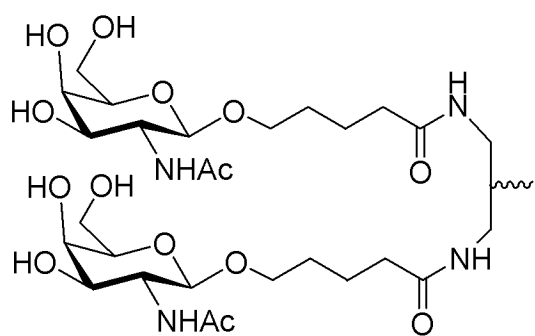
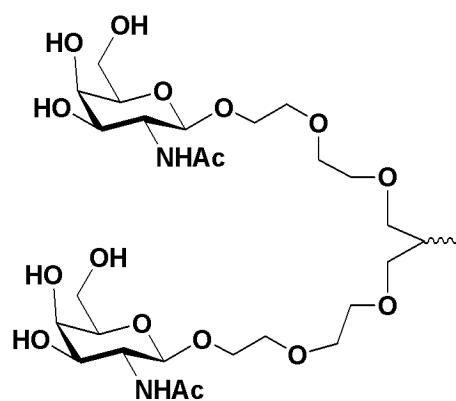
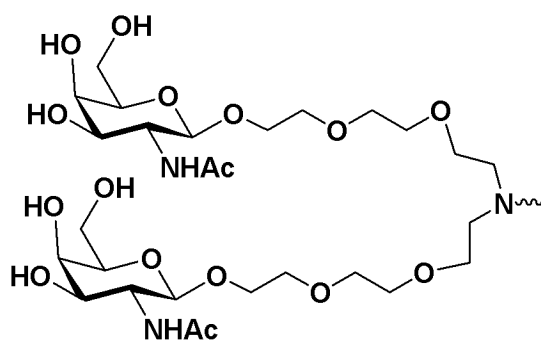
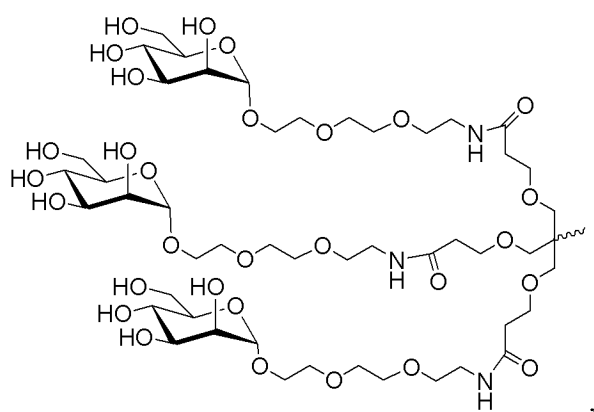
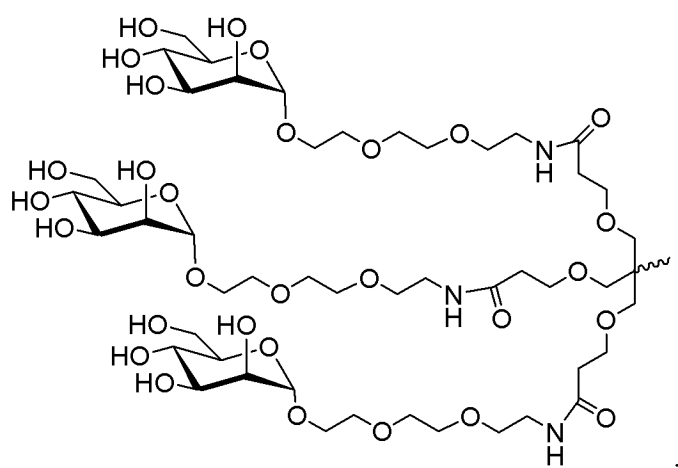
Формула (VII)

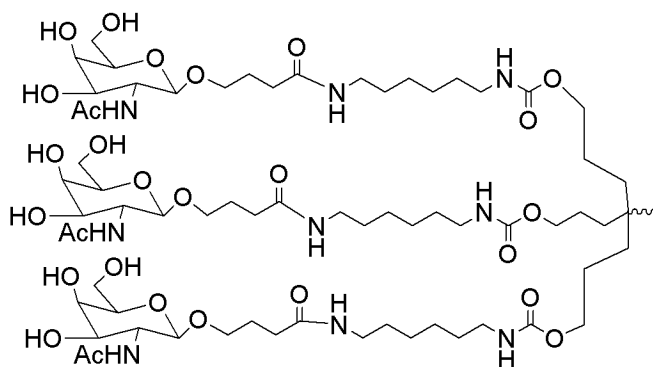
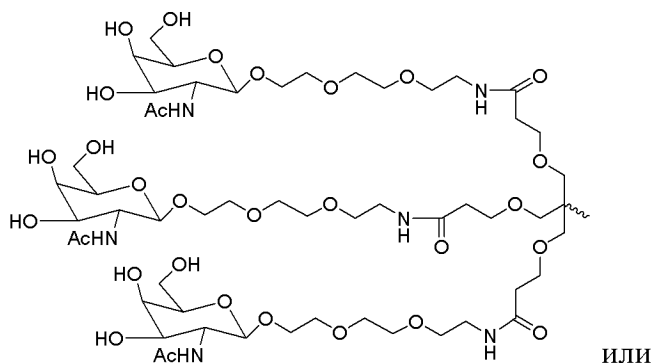
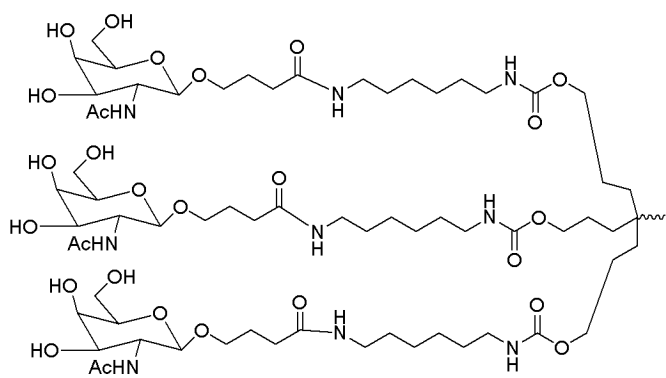
где L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой моносахарид, такой как производное GalNAc.

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, включают без ограничения следующие

соединения:







Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение конъюгатов РНК, включают в себя 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 тем самым в данный документ посредством

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, предпочтительно dsRNA, которые содержат две или больше химически разных областей, при этом каждая 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, повышенное поглощение клеткой и/или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы Н являются клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет нить РНК дуплекса РНК:ДНК. Активация РНКазы Н, следовательно, приводит к расщеплению РНК-мишени с усилением тем самым в значительной степени эффективности ингибирования экспрессии гена посредством iRNA. Следовательно, при использовании химерных dsRNA сравнимые результаты часто могут быть получены с более короткими iRNA по сравнению с фосфоротриоатдезоксидными dsRNA, гибридизирующимися с той же целевой областью. Расщепление РНК-мишени обычно можно выявить путем гель-электрофореза и при необходимости ассоциированными с гибридизацией нуклеиновых кислот методиками, известными в уровне техники.

В некоторых случаях РНК из iRNA может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул конъюгировали с iRNA для усиления активности, распределения в клетке или клеточного поглощения iRNA, и процедуры для выполнения таких типов конъюгирования доступны в научной литературе. В такие нелигандные фрагменты включены липидные фрагменты, такие как

холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 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-S-триэтилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 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-O-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-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. Ther.*, 1996, 277:923). Типичные патенты Соединенных Штатов, которые описывают получение таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные протоколы конъюгирования предусматривают синтез РНК, несущих аминлинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем осуществляют реагирование аминогруппы с молекулой, при этом конъюгацию осуществляют при помощи соответствующих реагентов присоединения 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.

Согласно некоторым вариантам осуществления способа двухнитевое средство для RNAi согласно настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из AD-58681, AD-59054, AD-61719 и AD-61444.

III. Доставка iRNA согласно настоящему изобретению

Доставку средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению к клетке например, клетке в субъекте, таком как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с ассоциированным с дефектной формой Serpinal нарушением, например, обусловленным дефектной формой Serpinal нарушением печени) можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA согласно настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения композиции, содержащей iRNA, например dsRNA, субъекту. В альтернативном случае, доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию iRNA. Такие альтернативные случаи описаны далее ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и W094/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Что касается доставки *in vivo*, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предупреждение неспецифических эффектов и 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, 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. Несколько исследований показали эффективное снижение уровня генных продуктов при введении iRNA локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF путем как инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, MJ., et al

(2004) *Retina* 24:132-138), так и субретиальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждает образование новых сосудов в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолью (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 ЦНС путем непосредственной доставки (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). Для введения iRNA системно для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или, в качестве альтернативы, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа действуют для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции на основе iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать при помощи химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, направленную против AroB iRNA, конъюгированную с фрагментом, представляющим собой липофильный холестерин, вводили системно мышам и получали в результате снижение уровня 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 ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинных 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, дендимер, 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 поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендимеры или полимеры могут либо быть связанными с iRNA, либо на них воздействуют для образования пузырька или мицеллы (см., например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себя iRNA. Образование пузырьков или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалистов в данной области техники (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 в полном объеме). 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), кардиолипид (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 образует 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 в полном объеме.

Кодируемые вектором iRNA согласно настоящему изобретению

iRNA, нацеленные на ген *Serpinal*, могут экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную РСТ публикацию № WO 00/22113, Conrad, международную РСТ публикацию № 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 целевых ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансгены также могут быть сконструированы с возможностью наследования их 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 инфицирования). В альтернативном случае, 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 виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, таким образом, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии с iRNA, как правило, являются ДНК-плазмидами или вирусными векторами. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, как

описано в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны от ряда коммерческих источников. Обычно предусмотрены такие векторы, содержащие 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 из организма пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в желательную целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии iRNA в виде комплекса с носителями-катионными липидами (например, олигофектамином) или носителями на основе некатионных липидов (например, Transit-TKO™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для разновидностей 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, как, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена при помощи маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гигромицину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают, без ограничения, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного 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 ортопокс, например векторы на основе вируса осповакцины или авипокс, например канарипокс или 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. В качестве альтернативы, конструкция может быть встроена 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 желательных целевых клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессия iRNA может быть точно регулируемой, например, путем использования 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-бета-D1-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование транскрипта iRNA.

Можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA. Например, можно использовать 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 *mdrl* к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам большей 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 использования, 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 использования в доставке *iRNA* согласно настоящему изобретению. Аденовирусы представляют 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 мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что 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) было показано использование аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макак-резус. Дополнительные примеры использования 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); PCT публикации W094/12649 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.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно использовать для доставки iRNA согласно настоящему изобретению (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). Согласно одному варианту осуществления iRNA может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одонитевых 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 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помощи ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки iRNA согласно настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипокс, как, например, оспа кур или канарипокс.

Тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замены 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 создать 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 на основе вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки генов. В альтернативном случае, когда вектор доставки целого гена может вырабатываться нативно рекомбинантными клетками, например ретровирусные векторы, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые вырабатывают систему доставки генов.

III. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, являются применимыми для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена *Serpinal*, например, ассоциированного с дефектной формой *Serpinal* нарушения, например, обусловленного дефектной формой *Serpinal* нарушения печени. Такие фармацевтические композиции составляют, исходя из способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса.

Фармацевтические композиции, содержащие средства для RNAi

согласно настоящему изобретению, могут быть, например, растворами с буфером или без него или композициями, содержащими фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции включают, например, водные или кристаллические композиции, липосомные составы, мицеллярные составы, эмульсии и векторы для генной терапии.

В способах согласно настоящему изобретению средство для RNAi можно вводить в растворе. Свободное средство для RNAi можно вводить в небуферном растворе, например, в солевом растворе или в воде. В качестве альтернативы, свободную siRNA также можно вводить в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию. В предпочтительном варианте осуществления буферным раствором является забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего средство для RNAi, можно корректировать, с тем чтобы он подходил для введения субъекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления буферный раствор дополнительно содержит средство для регулирования осмолярности раствора, так что осмолярность поддерживается на необходимом значении, например, на физиологических значениях для плазмы крови человека. Растворенные вещества, которые можно добавлять к буферному раствору для регулирования осмолярности, включают без ограничения белки, пептиды, аминокислоты, не поддающиеся метаболизму полимеры, витамины, ионы, сахара, метаболиты, органические кислоты, липиды или соли. Согласно некоторым вариантам осуществления средство для регулирования осмолярности раствора представляет собой соль. Согласно определенным вариантам осуществления средство для регулирования осмолярности раствора представляет собой хлорид натрия или хлорид калия.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена *Serpinal1*. Как правило, приемлемая доза iRNA согласно настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0

миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на разовую дозу.

Например, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно

[illegible]

[illegible]

7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 50 мг/кг, от

[illegible]

приблизительно 0,75 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. Согласно одному варианту осуществления dsRNA вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъекту можно вводить терапевтическое количество iRNA, такое как приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,

6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления, например, если композиция согласно настоящему изобретению содержит dsRNA, описанную в настоящем документе, и липид, то субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, такое как от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от

приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 3,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от
 приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от
 приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от
 приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 5,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 6,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 7,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 8 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 8,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от
 приблизительно 9 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от
 приблизительно 9,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Значения и
 диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным
 значениям, также подразумеваются как часть настоящего
 изобретения.

Например, dsRNA можно вводить в дозе приблизительно 0,1,
 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4,
 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7,
 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,
 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3,
 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6,
 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9,
 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2,
 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг.
 Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к
 перечисленным значениям, также подразумеваются как часть
 настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего
 изобретения, например, если двухнитевое средство для RNAi
 включает в себя модификации (например, один или несколько
 мотивов трех идентичных модификаций в трех последовательных
 нуклеотидах, в том числе один такой мотив в сайте расщепления

средства или рядом с ним), шесть фосфоротиоатных связей и лиганд, то такое средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,04 до

приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг или от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью настоящего изобретения, например, средство для RNAi можно вводить субъекту в дозе от приблизительно 0,015 мг/кг до приблизительно 0,45 мг/кг.

Например, средство для RNAi, например средство для RNAi в фармацевтической композиции, можно вводить в дозе приблизительно 0,01 мг/кг, 0,0125 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,0175 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,0225 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,0275 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,0325 мг/кг, 0,035 мг/кг, 0,0375 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,0425 мг/кг, 0,045 мг/кг, 0,0475 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,0525 мг/кг, 0,055 мг/кг, 0,0575 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,0625 мг/кг, 0,065 мг/кг, 0,0675 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,0725 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,0775 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,0825 мг/кг, 0,085 мг/кг, 0,0875 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,0925 мг/кг, 0,095 мг/кг, 0,0975 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,125 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,175 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,225 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,275 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,325 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,375 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,425 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,475 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг. Значения, промежуточные по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или iRNA можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня, или даже при

помощи непрерывной инфузии, или доставки посредством 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, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение iRNA в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно удобны для доставки средств в определенный участок, как, например, их можно применять со средствами согласно настоящему изобретению. В таком варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее множество суточной дозы.

Согласно другим вариантам осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, 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. Согласно некоторым вариантам осуществления согласно настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят один раз в неделю. Согласно другим вариантам осуществления согласно настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят каждые два месяца.

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, типы 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. Оценки эффективных доз и времени полужизни *in vivo* для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно получать, используя традиционные методологии, или на основании проведения исследований *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в другой части данного документа.

Достижения в области генетики мышей обеспечили ряд мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, как, например, нарушения печени, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем снижения экспрессии *Serpinal*. Такие модели можно использовать для проведения *in vivo* исследований *iRNA*, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в данной области и включают, например, мышь, содержащую трансген, экспрессирующий *Serpinal* человека.

Фармацевтические композиции согласно 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, подбололочное или интравентрикулярное введение. *iRNA* можно доставлять таким образом, чтобы происходило целенаправленное воздействие на конкретную ткань, как, например, печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. могут быть необходимы или желательны. Также можно использовать покрытые презервативы, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают те, 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, диолеил фосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеил фосфатидилэтаноламин (DOTMA)). iRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы, 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 C₁₋₂₀алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмиристат (IPM)), 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.

Составы с iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли

iRNA для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранный молекулярный ансамбль, например, липосому или мицеллу. Используемое в данном документе выражение "липосома" относится к пузырьку, состоящему из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные пузырьки, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию на основе iRNA.

Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе iRNA, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту приложения действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, при применении липосом к тканям бислой липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того, как идет слияние липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает iRNA, доставляется в клетку, где iRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления iRNA в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство для RNAi, могут быть получены рядом способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для того, чтобы образовывались мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может быть амфипатическим катионным липидом или липидным конъюгатом. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат средства для RNAi затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со средством для RNAi и конденсируются вокруг средства для RNAi с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например путем диализа, с получением липосомного препарата средства для RNAi.

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). pH также можно регулировать для благоприятной конденсации.

Способы получения стабильных полинуклеотидных средств доставки, которые включают комплекс полинуклеотида/катионного

липиды в качестве структурных компонентов средств доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных в Felgner, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham, *et al.* *Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:4194, 1978; Mayhew, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; и Fukunaga, *et al.* *Endocrinol.* 115:757, 1984. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов соответствующего для использования в качестве средств доставки размера включают разрушение ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно применять в тех случаях, когда желательны стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно единообразные агрегаты (Mayhew, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Такие способы легко адаптируются для упаковки препарата средства для RNAi в липосомы.

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

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно-заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее,

некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Липосомы с pH-чувствительностью использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, к монослоям клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в целевых клетках (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Один главный тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от полученного естественным образом фосфатидилхолина. 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.

Примеры других способов для *in vitro* и *in vivo* введения липосом в клетки включают патент США № 5283185; патент США № 5171678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; и Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

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™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в обеспечении 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, которые, как используется в данном документе, означают липосомы, содержащие один или несколько специальных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специальные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются те, в которых часть липидной составляющей, образующей пузырек, липосомы (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1} , или (В) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, в области техники полагают, что по меньшей мере для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженного поглощения 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 в данной области. Papahadjopoulos и соавт. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозид G_{M1} , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon и соавт. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen и соавт., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{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).

Согласно одному варианту осуществления используют

катионные липосомы. Катионные липосомы обладают преимуществом в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не могут сливаться настолько эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo*, и их можно использовать для доставки средств для RNAi к макрофагам.

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, биосовместимы и биоразрушаемы; липосомы могут включать широкий диапазон воды и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные средства для RNAi во внутренних отделениях от метаболизма и разрушения (Rosoff в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными аспектами в получении липосомных составов являются заряд поверхности липида, размер пузырька и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), можно использовать для образования малых липосом, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке средства для RNAi (см., например, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 касательно описания DOTMA и его применения с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно использовать в комбинации с фосфолипидом с образованием пузырьков, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки сильно анионных нуклеиновых кислот в клетки культуры живых тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. В тех случаях, когда используют липосомы с

достаточным положительным зарядом, тогда суммарный заряд полученных комплексов является также положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают те, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермином, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPEs") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см. Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Как сообщалось, липополизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным при трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, как указывается, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы в особенности подходят для местного применения, при этом липосомы проявляют некоторые преимущества по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие по отношению к высокой системной абсорбции введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в необходимой мишени и возможность вводить средство для RNAi в кожу. Согласно некоторым вариантам осуществления липосомы используют для доставки средства для RNAi к эпидермальным клеткам и также для усиления проникновения средства для RNAi в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Была документально зафиксирована местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. и Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276. 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

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	I
(глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир)	и	Novasome
		II
(глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир),		

использовали для доставки лекарственного средства в слой дермы кожи мышей. Такие составы со средством для RNAi пригодны для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают iRNA, могут быть получены с высокой способностью деформироваться. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше, чем средний радиус липосомы. Например, типом деформируемых липосом являются трансферсомы. Трансферсомы можно получить

путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы, которые включают средство для RNAi, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства для RNAi к кератиноцитам в коже. Для того, чтобы пройти через неповрежденную кожу млекопитающего, липидные пузырьки должны пройти через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего внутрикожного градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и зачастую могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, пригодные в настоящем изобретении, описаны в предварительной заявке США с серийным № 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748, поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г., и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В РСТ заявке № РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

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 капельки. Трансферсомы являются приспособляющимися к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор в коже), 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 использовали

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 естественных, так и синтетических, является использование гидролипидного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, используемых в составах (Rieger в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 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 pH. Обычно их значения HLB 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, ацилами́ды 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 алкилами́ды, 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).

iRNA для применения в способах согласно настоящему изобретению может также предусматриваться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы организованы в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекулы направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части соприкасающимися с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C₈-

C₂₂алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять во время или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться, по сути, при любом виде смешивания ингредиентов, кроме интенсивного перемешивания для получения мицелл с меньшим размером.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию с siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений с интенсивным смешиванием.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы, фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который находится

под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся одной, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствует две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением части содержимого, например, посредством дозирующего клапана. Распыляемая доза фармацевтического средства выталкивается из дозирующего клапана в виде мелкодисперсной струи.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметиловый эфир и простой диэтиловый эфир. Согласно определенным вариантам осуществления можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены при помощи проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто необходимо увеличить, например, по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

Липидные частицы

iRNA, например dsRNA согласно настоящему изобретению, может быть полностью инкапсулирована в липидном составе, например LNP, или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. LNP содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который приведен в РСТ публикации № WO 00/03683. Частицы в соответствии с настоящим изобретением, как правило, имеют средний диаметр от приблизительно 50 нм до приблизительно

150 нм, чаще от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм и практически являются нетоксичными. 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 раскрыт, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и PCT публикации № 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 или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан

(DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 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 (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-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 составлять от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Согласно другому варианту осуществления можно использовать 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 номер 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]-диоксолана; 10% DSPC; 40% холестерина; 10% PEG-C-DMG (мольный процент) с размером частиц $63,0 \pm 20$ нм и соотношением siRNA/липид 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин

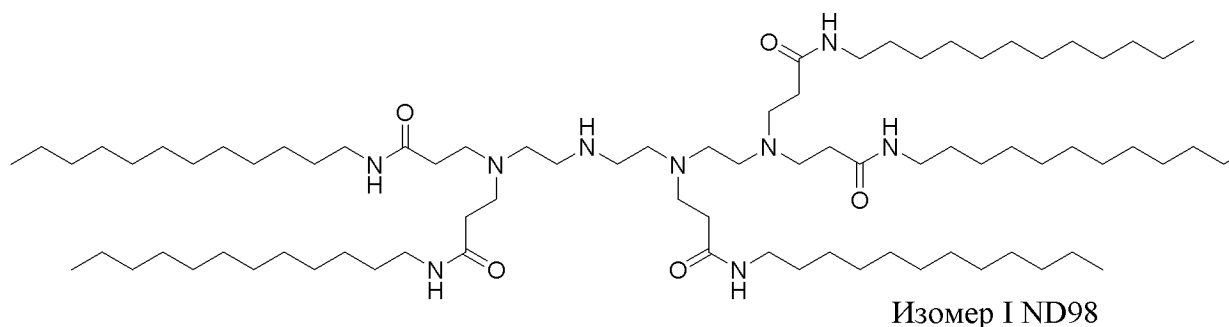
(DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароил-фосфатидил-этаноламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от приблизительно 5 мол.% до приблизительно 90 мол.%, приблизительно 10 мол.% 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 (PEG)-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 (Ci₂), PEG-димиристоилоксипропил (Ci₄), PEG-дипальмитилоксипропил (Ci₆) или PEG-дистеарилоксипропил (Ci₈). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% 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 мол.% до приблизительно 60 мол.% или приблизительно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Согласно одному варианту осуществления липидоид ND98·4HCl (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 использовать 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, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например, в молярном 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) при помощи, 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 солевым раствором (PBS) с pH приблизительно 7, например, pH приблизительно 6,9, pH приблизительно 7,0, pH приблизительно 7,1, pH приблизительно 7,2, pH приблизительно 7,3 или pH приблизительно 7,4.



Формула 1

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

Дополнительные иллюстративные составы с липидом-dsRNA описаны в таблице А.

Таблица А

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
--	---------------------------------	--

LNP-1	1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1

LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодecil) амино) этил) (2-гидроксидодecil) амино) этил) пиперазин-1-ил) этилазанедиил) дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:sirNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:sirNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:sirNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 10:1

LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP22	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

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

PEG-DSG: PEG-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 LNP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая, таким образом, включена 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 № PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

МС3-содержащие составы описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой, таким образом, включено 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.

C12-200-содержащие составы описаны в предварительной заявке США с серийным № 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и международной заявке № PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

Синтез ионизируемых/катионных липидов

Любое из соединений, например, катионные липиды и т.п., используемые в частицах нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению, 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-пентинил, 3-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, $-C(=O)$ алкенил и $-C(=O)$ 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, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамыл, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т.п.

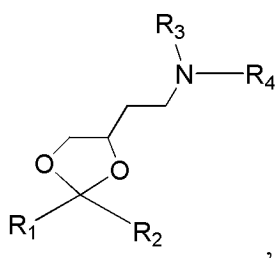
Выражения “необязательно замещенный алкил”, “необязательно замещенный алкенил”, “необязательно замещенный алкинил”, “необязательно замещенный ацил” и “необязательно замещенный гетероцикл” означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксо-заместителя ($=O$) замещаются два атома водорода. В связи с этим, заместители включают оксо, галоген, гетероцикл, $-CN$, $-OR_x$, NR_xR_y , $NR_xC(=O)R_y$, $NR_xSO_2R_y$, $C(=O)R_x$, $C(=O)OR_x$, $C(=O)NR_xR_y$, $-SOnR_x$ и $SOnNR_xR_y$, где n равняется 0, 1 или 2, R_x и R_y являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных заместителей алкила и гетероцикла дополнительно может быть замещен одним или несколькими из оксо, галогена, $-OH$, $-CN$, алкила, $-OR_x$, гетероцикла, NR_xR_y , $NR_xC(=O)R_y$, $NR_xSO_2R_y$, $C(=O)R_x$, $C(=O)OR_x$, $C(=O)NR_xR_y$, $SOnR_x$ и $SOnNR_xR_y$.

“Галоген” означает фтор, хлор, бром и йод.

Согласно некоторым вариантам осуществления в способах согласно настоящему изобретению может потребоваться использование защитных групп. Методика с использованием 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 используют “защитную группу для спиртовой группы”. “Защитная группа для спиртовой группы” представляет собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную химическую активность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять при помощи методик, хорошо известных в данной области.

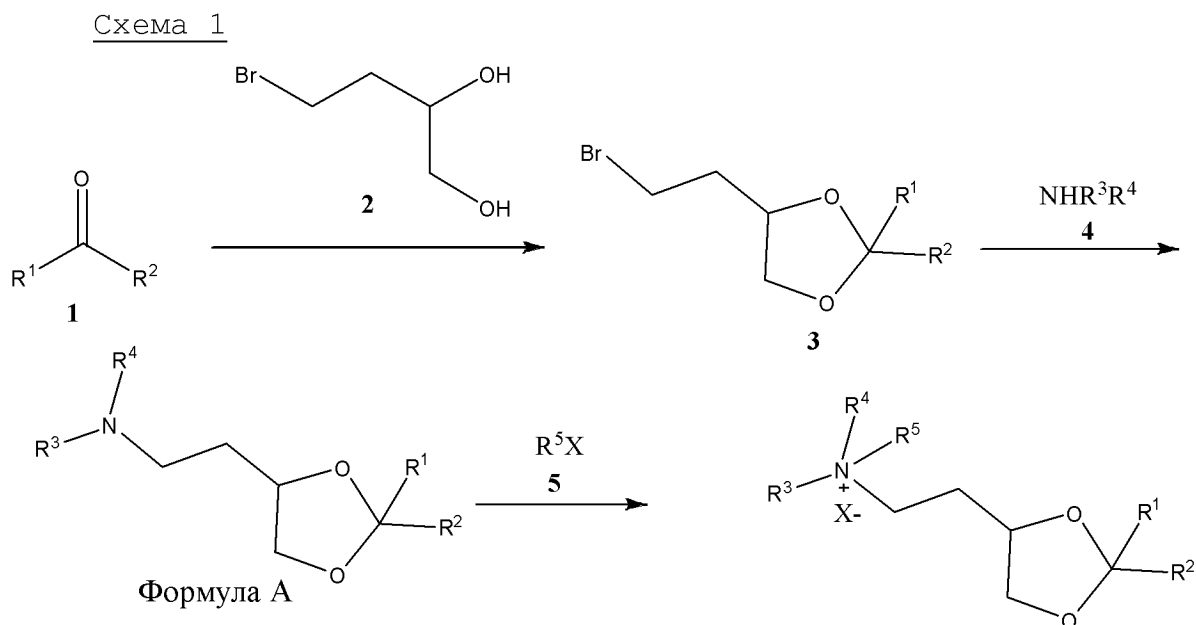
Синтез формулы А

Согласно некоторым вариантам осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению составляют при помощи катионного липида формулы А:



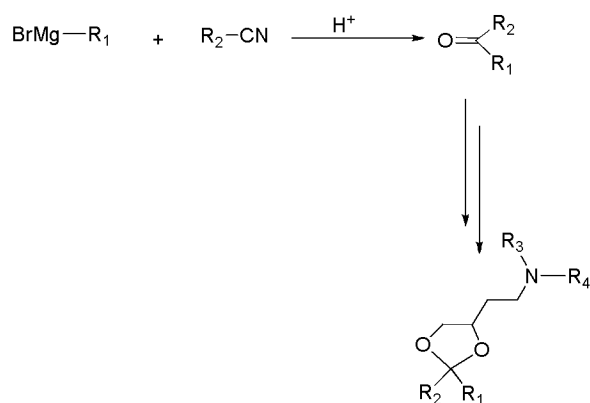
где R1 и R2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R3 и R4 независимо представляют собой низший алкил, или R3 и R4 могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. Согласно некоторым вариантам осуществления катионный липид представляет собой ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). Как правило, липид формулы А, 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 А, где R1 и R2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R3 и R4 независимо представляют собой низший алкил или R3 и R4 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 кетала 3 амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А 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.

Схема 2



В качестве альтернативы, исходный материал, кетон 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 липиды формулы А является таким, как описано на схеме 1.

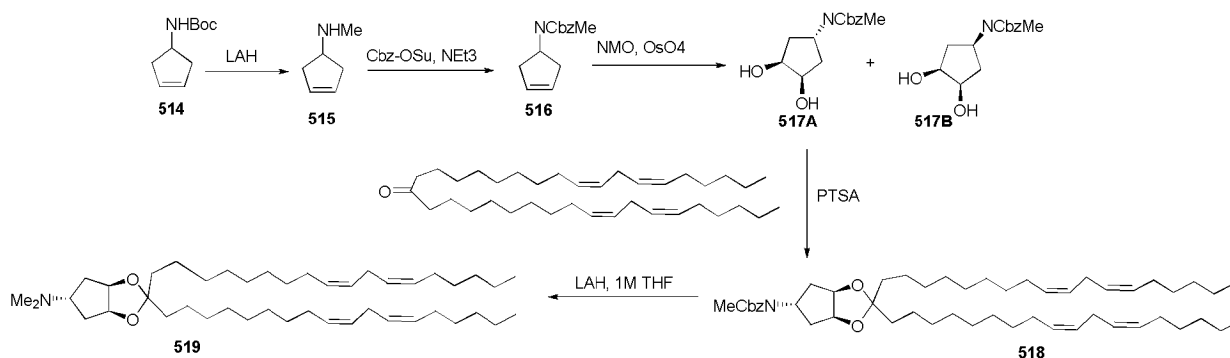
Синтез MC3

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 проходил через колонку с силикагелем (20 г) с использованием 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 кетала 519 [ALNY-100] осуществляли с использованием следующей

схемы

3:



Синтез 515

К перемешиваемой суспензии LiAlH₄ (3,74 г, 0,09852 моля) в

200 мл безводного THF в двухгорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моля) в 70 мл THF при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до 0°C и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора Na₂SO₄. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали, и разводили 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl, и перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г. 1H-ЯМР (DMSO, 400 МГц): δ = 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 перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двухгорлой RBF добавляли NEt₃ (37,2 мл, 0,2669 моля) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонилокси)-сукцинимид (20 г, 0,08007 моля) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч., определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно раствором 1 н. HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором NaHCO₃ (1×50 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%). 1H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ = 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 517A и 517B

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моля) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одногорлой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метил-морфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моля), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO₄ (0,275 г, 0,00108 моля) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~3 ч.) смесь гасили при помощи добавления твердого Na₂SO₃ и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO₃ (1×50 мл), вода (1×30 мл) и в конце соляной раствор (1× 50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na₂SO₄ 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.

517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). ¹H-ЯМР (DMSO, 400 МГц): δ = 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. ¹H-ЯМР (CDCl₃, 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 ЛАН в THF (1 M, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч., затем охлаждали опять на ледяной бане.

Смесь аккуратно гидролизуют насыщенным водным Na_2SO_4 , затем фильтруют через целит и переводят в масло. С помощью колоночной хроматографии получают чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получают в виде бесцветного масла. 13С-ЯМР δ = 130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 22,6, 14,1; электрораспыление MS (+ve): Молекулярный вес для $\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_2$ (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, используя, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Размер частиц должен быть 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 при отсутствии разрушающего состав поверхностно-активного вещества, например, 0,5% Triton-X100. Общую dsRNA в составе можно определять по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, по отношению к калибровочной 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 LNP 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 нм до приблизительно по меньшей мере 110 нм, от приблизительно по меньшей мере 60 нм до приблизительно по меньшей мере 100 нм или от приблизительно по меньшей мере 80 нм 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, вводятся 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 урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауроезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат 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, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). Согласно некоторым вариантам осуществления используют 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-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе распыляемых высушенных частиц, или образуют комплексы с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают поли-аминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), 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), подбололочечного, интравентрикулярного или внутripеченочного 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, который включает, без ограничения, предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. В частности, предпочтительными являются составы, которые целенаправленно воздействуют на печень при лечении заболеваний печени, таких как гепатокарцинома.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, 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 согласно настоящему изобретению могут быть составлены в любой из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, пластичные гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно настоящему изобретению 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., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 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 диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "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). В качестве альтернативы, 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 добавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие 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/в включают маленькие водные капельки, составляющие эмульсию в/о/в. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию о/в/о.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью, или она у них 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 высокодисперсные 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., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и их рассматривали 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., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно

являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного средства было названо гидрофильно/липофильным балансом (HLB) и является ценным средством в категоризации и выборе поверхностно-активных средств при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделять на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионные, анионные, катионные и амфотерные (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., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые 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, тем не менее сохраняя свою полутвердую консистенцию. Мелкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов в особенности 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 глицерил тристеарат.

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

Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 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 карбоксипропилцеллюлозу) 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 и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в составы эмульсий, включают метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные соли аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры *p*-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют к составам эмульсий для предупреждения разрушения состава. Используемые антиоксиданты могут быть ловушками свободных радикалов, как, например, токоферолы, алкил галлаты, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановителями, такими как аскорбиновая кислота и матабисульфит натрия, и синергистами антиоксидантов, такими как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение составов эмульсий посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения были 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., volume 1, p. 199). Составы эмульсий для пероральной доставки очень широко применяют из-за удобства составления, а также с позиции эффективности при абсорбции 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., volume 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 находятся среди материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий o/w.

ii. Микроэмульсии

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 в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, 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 для образования 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, pages 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 используемого масла и поверхностно-активного вещества и 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 фазовой диаграммы, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии (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., volume 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, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), 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 данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать без ограничения материалы, такие как Captex 300, Captex 355, Capmul MSM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C8-C12) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полиглицеролизированные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C8-C10 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 увеличения 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, улучшенная 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 окружающего воздуха. 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 локальное клеточное поглощение 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, используемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, могут классифицироваться, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие неповерхностно-активные вещества (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов рассматривался выше.

iii. Микрочастицы

Средство для RNAi согласно настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи сушки распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдосжиженном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

iv. Вещества, способствующие проникновению

Согласно одному варианту осуществления в настоящем изобретении применяют 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 нехелатирующие неповерхностно-активные 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, p.92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан ниже более подробно.

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. Вдобавок к солям желчных кислот и жирным кислотам, 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).

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, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миистат, 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).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в 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 (ПОЕ) (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 в *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, 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 (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетоннов (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).

Используемые в данном документе нехелатирующие неповерхностно-активные соединения, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, 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, page 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 поглощение 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 РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния),

реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, USA), 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 VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (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™ (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.

v. 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 *per 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 фосфоротиоатной 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 (Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *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 использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые 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 уровнях применения, установленных в данной области. 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 вещества, 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 душистыми веществами 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.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (a) одно или несколько соединений, представляющих собой *iRNA*, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от *RNAi*, и которые пригодны в лечении нарушения свертываемости крови. Примеры таких средств включают, без ограничения, противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза. Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с *iRNA*, описанными в данном документе. Другие средства, пригодные для лечения заболеваний печени, включают

телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как телапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патент США № 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217, Tung et al., и в публикации заявки на патент США № 2004/0127488, Hale et al..

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 является терапевтическим индексом, и его можно выражать как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах клеточных культур и исследованиях на животных, можно использовать при составлении ряда доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включают ED50 с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться 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 клеточных культур. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона концентрации циркулирующего 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), как устанавливают в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодной дозы у людей. Уровни в плазме можно измерять, например, при помощи высокoeffективной

жидкостной хроматографии.

В дополнении к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией *Serpinal*. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

IV. Способы ингибирования экспрессии *Serpinal*

Настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке, с ингибированием тем самым экспрессии *Serpinal* в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. *In vivo* приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает приведение клетки или группы клеток субъекта, например субъекта-человека, в контакт со средством для RNAi. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Приведение в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как рассматривалось выше. Более того, приведение в контакт с клеткой можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного в данной области. Согласно предпочтительным вариантам осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд, представляющий собой GalNAc₃, или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией" и другими подобными терминами, и он

предусматривает любой уровень ингибирования.

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии *Serpinal*" означает ингибирование экспрессии любого гена *Serpinal* (такого как, например, ген *Serpinal* мыши, ген *Serpinal* крысы, ген *Serpinal* обезьяны или ген *Serpinal* человека), а также вариантов или мутантов гена *Serpinal*. Таким образом, ген *Serpinal* может быть геном *Serpinal* дикого типа, мутантным геном *Serpinal* или трансгенным геном *Serpinal* в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена *Serpinal*" включает любой уровень ингибирования гена *Serpinal*, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена *Serpinal*. Экспрессию гена *Serpinal* можно оценивать, исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена *Serpinal*, например, уровня mRNA *Serpinal*, уровня белка *Serpinal* или уровней липидов. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые связаны с экспрессией *Serpinal*, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

Согласно некоторым вариантам осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессию гена *Serpinal* ингибируют по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%,

по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%. по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена *Serpinal* может служить снижение количества mRNA, экспрессируемой первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген *Serpinal* и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi согласно настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi согласно настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена *Serpinal* ингибируется по сравнению со второй клеткой или второй группой клеток, по сути, идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(ые) клетка(и)). Согласно предпочтительным вариантам осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня mRNA в обработанных клетках как процент от уровня mRNA в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

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

В качестве альтернативы, ингибирование экспрессии гена *Serpinal* можно оценивать по снижению параметра, который функционально связан с экспрессией гена *Serpinal*, например, экспрессией белка *Serpinal*, такого как ALT, щелочная фосфатаза,

билирубин, протромбин и альбумин. Сайленсинг гена *Serpinal* можно выявить в любой клетке, экспрессирующей *Serpinal* либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области. Печень является основным местом экспрессии *Serpinal*. Другие важные места экспрессии включают легкие и кишечник.

Доказательством ингибирования экспрессии белка *Serpinal* может служить снижение уровня белка *Serpinal*, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии mRNA, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе обработанных клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе контрольных клеток.

Контрольная клетка или группа контрольных клеток, которые можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена *Serpinal*, включают клетку или группу клеток, которые еще не были в контакте со средством для RNAi согласно настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа контрольных клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством для RNAi.

Уровень mRNA *Serpinal*, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять при помощи любого способа, известного в данной области, для оценки экспрессии mRNA. Согласно одному варианту осуществления уровень экспрессии *Serpinal* в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, mRNA гена *Serpinal*. РНК можно извлекать из клеток при помощи методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз (Melton et al., Nuc.

Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричные анализы.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии *Serpinal* определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", используемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим *Serpinal*. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Могут быть особым образом сконструированы зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, без ограничения, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные mRNA можно использовать при анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают, без ограничения, анализы, представляющие собой саузерн- или нозерн-блоттинг, анализы, представляющие собой полимеразную цепную реакцию (PCR), и матрицы с зондами. Один способ определения уровней mRNA включает приведение выделенной mRNA в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с mRNA *Serpinal*. Согласно одному варианту осуществления mRNA иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем пропускания выделенной mRNA через агарозный гель и переноса mRNA из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и mRNA приводят в контакт с зондом(ами), например, на генном микрочипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения mRNA для применения в определении уровней mRNA *Serpinal*.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии *Serpinal* в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК), например, mRNA в образце, например, при помощи RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в Mullis, 1987, патенте США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany

(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательностей (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), транскрипционно-опосредованной амплификационной системы (Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу "катыщегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, за которым следует обнаружение амплифицированных молекул при помощи методик, хорошо известных специалисту в данной области. Такие схемы обнаружения особенно пригодны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах согласно настоящему изобретению уровни экспрессии *Serpinal* определяют при помощи флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™ System).

Уровни экспрессии mRNA *Serpinal* можно контролировать при помощи мембранного блота (как, например, используемого при анализе гибридизации, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанную нуклеиновую кислоту). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ при помощи ссылки. Определение уровня экспрессии *Serpinal* также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления уровень экспрессии mRNA оценивают с использованием анализов с разветвленной ДНК (bDNA) или PCR в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в разделе "Примеры", представленном в данном документе.

Уровень экспрессии белка *Serpinal* можно определить, используя любой способ, известный в данной области для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию

(TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Выражение "образец", используемое в данном документе, означает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. Согласно определенным вариантам осуществления образцы можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). Согласно предпочтительным вариантам осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму, полученные от субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени, полученную от субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов согласно настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту так, что средство для RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии Serpinal можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня mRNA Serpinal или белка Serpinal в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления местом является печень. Местом также может быть подсекция или подгруппа клеток из любого из указанных выше мест. Место также

может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

V. Способы лечения или предупреждения ассоциированного с Serpinal заболевания

Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения или предупреждения заболеваний и состояний, на которые можно воздействовать путем понижающей регуляции экспрессии гена Serpinal. Например, композиции, описанные в данном документе, можно использовать для лечения ассоциированных с Serpinal заболеваний, таких как болезни печени, например, хроническая болезнь печени, воспаление печени, цирроз, фиброз печени и/или печеночноклеточная карцинома, и других патологических состояний, которые могут быть ассоциированы с этими нарушениями, таких как воспаление легких, эмфизема и COPD.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования развития печеночноклеточной карциномы у субъекта, например, субъекта с дефектным вариантом Serpinal. Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества композиции в соответствии с настоящим изобретением субъекту, с ингибированием тем самым развития печеночноклеточной карциномы у субъекта.

Способы и применения композиций согласно настоящему изобретению для снижения накопления неправильно свернутого Serpinal в печени субъекта, например, субъекта с дефектным вариантом Serpinal, также предусматриваются настоящим изобретением. Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества композиции в соответствии с настоящим изобретением субъекту, со снижением тем самым накопления неправильно свернутого Serpinal в печени субъекта.

Используемое в данном документе выражение "субъект" включает человека или отличное от человека животное, предпочтительно позвоночное и более предпочтительно млекопитающее. Субъект может включать трансгенный организм. Наиболее предпочтительно, субъектом является человек, как, например, человек, страдающий Serpinal-ассоциированным заболеванием или предрасположенный к его развитию. Согласно

одному варианту осуществления субъект, страдающий *Serpinal*-ассоциированным заболеванием или предрасположенный к его развитию, имеет один или несколько дефектных аллелей *Serpinal*, например, аллель PIZ, PIS или PIM(Malton).

Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения средство на основе *iRNA* в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации с дополнительным терапевтическим средством. Средство на основе *iRNA* и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в комбинации в одной и той же композиции, например парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или другим способом, описанным в данном документе.

Примеры дополнительных терапевтических средств, подходящих для применения в способах в соответствии с настоящим изобретением, включают средства, известные для лечения нарушений печени, таких как цирроз печени. Например, средство на основе *iRNA*, описанное в настоящем изобретении, можно вводить, например, с урсodeзоксихолевой кислотой (UDCA), иммунодепрессивными средствами, метотрексатом, кортикостероидами, циклоспорином, колхицином, средствами для лечения зуда, такими как антигистаминные средства, холестирамином, колестиполом, рифампином, дронабинолом (маринолом), а также плазмаферезом, профилактическими антибиотиками, ультрафиолетовым излучением, цинковыми добавками и вакцинацией против гепатита А, гриппа и пневмококков.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов согласно настоящему изобретению, экспрессия *Serpinal* снижается в течение длительного отрезка времени, например, по меньшей мере одной недели, двух недель, трех недель, или четырех недель, или дольше. Например, в некоторых случаях экспрессия гена *Serpinal* подавляется по меньшей мере на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или 55% путем введения средства на основе *iRNA*, описанного в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления ген *Serpinal* подавляется по меньшей мере на приблизительно 60%, 70%

или 80% путем введения средства на основе iRNA. Согласно некоторым вариантам осуществления ген *Serpinal* подавляется по меньшей мере на приблизительно 85%, 90% или 95% путем введения средства на основе iRNA.

Средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту при помощи любого способа введения, известного из уровня техники, в том числе, без ограничения, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, спинномозгового и любых их комбинаций. Согласно предпочтительным вариантам осуществления средства на основе iRNA вводят подкожно.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. В случае инъекции депо-препарата средства на основе iRNA могут высвобождаться устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, при помощи инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для получения необходимого эффекта, например, необходимого ингибирования *Serpinal*, или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыворотке. Инъекции депо-препарата могут предусматривать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. Согласно предпочтительным вариантам осуществления инъекция депо-препарата является подкожной инъекцией.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. Согласно определенным вариантам осуществления насос является подкожно имплантированным осмотическим насосом. Согласно другим вариантам осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. Согласно предпочтительным вариантам осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. Согласно другим вариантам осуществления насос является имплантированным

хирургическим путем насосом, который доставляет средство для RNAi в печень.

Другие способы введения включают эпидуральное, внутрицеребральное, интрацеребровентрикулярное, назальное введение, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрикостную инфузию, подоболочечное, и интравитреальное, и легочное. Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо местное или системное лечение, и исходя из области, которая подлежит лечению. Путь и место введения можно выбрать для увеличения нацеленного воздействия.

Способы в соответствии с настоящим изобретением предусматривают введение средства на основе iRNA в дозе, достаточной для подавления/снижения уровней mRNA *Serpina1* в течение по меньшей мере 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней; и необязательно введение второй разовой дозы средства на основе iRNA, где вторую разовую дозу вводят по меньшей мере через 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней после введения первой разовой дозы, ингибируя, таким образом, экспрессию гена *Serpina1* у субъекта.

Согласно одному варианту осуществления дозы средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению вводят 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 введения могут продолжаться в течение одного, двух, трех или шести месяцев, или одного года, или дольше.

Как правило, средство на основе iRNA не активизирует иммунную систему, например, оно не повышает уровни цитокинов, как, например, уровни TNF-альфа или IFN-альфа. Например, при измерении при помощи анализа, такого как анализ PBMC *in vitro*, как, например, описано в данном документе, повышение уровней TNF-альфа или IFN-альфа составляет менее 30%, 20% или 10% от уровня в контрольных клетках, обработанных контрольным средством на основе iRNA, таким как средство на основе iRNA, которое не нацелено на *Serpina1*.

Например, субъекту можно вводить терапевтическое

количество средства на основе iRNA, как, например, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг или 2,5 мг/кг dsRNA. Средство на основе iRNA можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как, например, в течение периода 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут или 25 минут. Введение повторяют, например, регулярно, как, например, один раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше.

После первичного режима лечения средства для лечения можно вводить менее часто. Например, после введения один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше. Введение средства на основе iRNA может снижать уровни Serpina1, например, в клетке, ткани, крови, моче, органе (например, печени) или другой части организма пациента 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 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.

Перед введением полной дозы средства на основе iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу и наблюдать их в отношении нежелательных явлений, как, например, аллергических реакций, или в отношении повышенных уровней липидов или кровяного давления. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, как, например, повышения уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа). Типичная меньшая доза представляет собой дозу, которая приводит в результате к частоте инфузионной реакции, меньшей или равной 5%.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптома, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра,

соответствующего данному заболеванию, лечение которого осуществляется или предупреждение которого предусматривается. Наблюдение в отношении эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров относится к компетенции специалиста в данной области техники. Например, эффективность лечения фиброза печени или уменьшения симптомов фиброза печени можно оценивать, например, путем периодического наблюдения в отношении маркеров фиброза печени: α -2-макроглобулина (α -MA), трансферрина, аполипопротеина A1, гиалуроновой кислоты (HA), ламинина, N-концевого пептида проколлагена III (PIIINP), 7S коллагена IV (7S-IV), общего билирубина, неконъюгированного билирубина, аланинаминотрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST), AST/ALT, γ -глутамилтранспептидазы (GGT), щелочной фосфатазы (ALP), альбумина, альбумина/глобулина, азота мочевины крови (BUN), креатинина (Cr), триглицерида, холестерина, липопротеина высокой плотности и липопротеина низкой плотности, а также пункционной биопсии печени. Можно измерять маркеры фиброза печени и/или можно осуществлять пункционную биопсию печени до лечения (исходные данные) и впоследствии (последующие данные) при осуществлении режима лечения.

При помощи сравнения последующих данных с исходными данными врач получает показатель эффективности лечения. Наблюдение в отношении эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров относится к компетенции специалиста в данной области техники. Применительно к введению средства на основе iRNA, нацеленного на Serpinal, или фармацевтической композиция, содержащей его, "эффективный в отношении" заболевания, ассоциированного с Serpinal, такого как болезнь печени, например, состояние, связанное с фиброзом печени, означает, что введение средства на основе iRNA в соответствии с настоящим изобретением клинически соответствующим образом приводит в результате к благоприятному эффекту по меньшей мере для статистически значимой части пациентов, например, ослаблению симптомов, излечению, уменьшению нагрузки, обусловленной

заболеванием, уменьшению массы опухоли или количества клеток, увеличению продолжительности жизни, улучшению качества жизни или другому эффекту, который, как правило, определяется как положительный врачами, знакомыми с лечением болезней печени.

В способах в соответствии с настоящим изобретением можно применять средство на основе iRNA, описанное в данном документе, для лечения индивидуумов, у которых имеются признаки, симптомы и/или маркеры заболевания, ассоциированного с *Serpina1*, или у которых было диагностировано это заболевание, или подвергающихся риску этого заболевания, такого как болезнь печени, например, воспаление печени, цирроз, фиброз печени и/или печеночноклеточная карцинома. Специалист в данной области техники может легко отследить признаки, симптомы и/или маркеры этих нарушений у субъектов, получающих лечение с использованием средства на основе iRNA, описанного в данном документе, и анализировать уменьшение этих признаков, симптомов и/или маркеров по меньшей мере на 10% и предпочтительно до клинического уровня, отражающего низкий риск болезни печени.

Эффект лечения или предупредительный эффект очевидны, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких показателей болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера, благоприятное изменение измеряемого показателя заболевания (такого как функция печени, описанная выше) по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может служить признаком эффективного лечения.

Об эффективности для данного средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению или состава такого средства на основе iRNA можно также судить при помощи экспериментальной животной модели для данного заболевания, которая известна из уровня техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения доказана, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

Эффект лечения или предупредительный эффект также очевидны, когда наблюдается ослабление или облегчение одного или нескольких симптомов. Например, лечение или предупреждение являются эффективными в случае ослабления или облегчения одного или нескольких из слабости, усталости, потери веса, тошноты, рвоты, вздутия живота, отека конечностей, чрезмерного зуда и желтизны глаз и/или кожи.

Для определенных показателей эффективность можно измерять по увеличению сывороточных уровней белка Serpina1. В качестве примера, увеличение сывороточных уровней надлежащим образом свернутого Serpina1 по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200% или более может служить признаком эффективного лечения.

В качестве альтернативы, эффективность можно измерять по уменьшению тяжести заболевания, как определено специалистом в области техники, связанной с диагностикой, исходя из принятой в клинической практике шкалы оценки тяжести заболевания, например, в качестве одного примера, показатель по шкале Чайльда-Пью (в некоторых случаях показатель по шкале Чайльда-Туркотта-Пью). В этом примере, прогноз для хронической болезни печени, главным образом цирроза, определяют по суммарному баллу для пяти клинических количественных показателей, билирубина, сывороточного альбумина, INR, асцита и печеночной энцефалопатии. Каждому маркеру присваивается значение от 1 до 3, и при этом общее значение используется для получения балла, классифицированного как А (5-6 баллов), В (7-9 баллов) или С (10-15 баллов), который может коррелировать с уровнями выживания в течение одного и двух лет. Способы определения и анализа с использованием баллов по шкале Чайльда-Пью хорошо известны из уровня техники (Farnsworth et al, Am J Surgery 2004 188:580-583; Child and Turcotte. Surgery and portal hypertension. In: The liver and portal hypertension. Edited by CG Child. Philadelphia: Saunders 1964:50-64; Pugh et al, Br J Surg 1973;60:648-52). В этом примере эффективность можно измерять с использованием перемещения пациента, например, из

"В" в "А." Любое положительное изменение, приводящее в результате, например, к уменьшению тяжести заболевания, измеренной с использованием соответствующей шкалы, отражает соответствующее лечение с использованием iRNA или состава на основе iRNA, как описано в данном документе.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi вводят в дозе от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, например, от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,25 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 мг/кг до приблизительно 35 мг/кг или от приблизительно 40 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi вводят в дозе приблизительно 0,25 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, приблизительно 14 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг, приблизительно 17 мг/кг, приблизительно 18 мг/кг, приблизительно 19 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 21 мг/кг, приблизительно 22 мг/кг, приблизительно 23 мг/кг, приблизительно 24 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 26 мг/кг, приблизительно 27 мг/кг, приблизительно 28 мг/кг, приблизительно 29 мг/кг, 30 мг/кг, приблизительно 31 мг/кг, приблизительно 32 мг/кг, приблизительно 33 мг/кг, приблизительно 34 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг,

приблизительно 36 мг/кг, приблизительно 37 мг/кг,
 приблизительно 38 мг/кг, приблизительно 39 мг/кг,
 приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 41 мг/кг,
 приблизительно 42 мг/кг, приблизительно 43 мг/кг,
 приблизительно 44 мг/кг, приблизительно 45 мг/кг,
 приблизительно 46 мг/кг, приблизительно 47 мг/кг,
 приблизительно 48 мг/кг, приблизительно 49 мг/кг или
 приблизительно 50 мг/кг.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, например, если двухнитевое средство для RNAi предусматривает модификации (например, один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, в том числе один такой мотив в сайте расщепления средства или рядом с ним), шесть фосфоротиоатных связей и лиганд, то такое средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,03 до

приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,03 до
 приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,03 до
 приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,03 до
 приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до
 приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до
 приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до
 приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до
 приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до
 приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,04 до
 приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,04 до
 приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,04 до
 приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,04 до
 приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,04 до
 приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до
 приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до
 приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до
 приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до
 приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,05 до
 приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до
 приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,05 до
 приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,05 до
 приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,05 до
 приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до
 приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до
 приблизительно 0,08 мг/кг или от приблизительно 0,05 мг/кг до
 приблизительно 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные
 по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью
 настоящего изобретения, например, средство для RNAi можно
 вводить субъекту в дозе от приблизительно 0,015 мг/кг до
 приблизительно 0,45 мг/кг.

Например, средство для RNAi, например средство для RNAi в
 фармацевтической композиции, можно вводить в дозе
 приблизительно 0,01 мг/кг, 0,0125 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,0175
 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,0225 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,0275 мг/кг,
 0,03 мг/кг, 0,0325 мг/кг, 0,035 мг/кг, 0,0375 мг/кг, 0,04
 мг/кг, 0,0425 мг/кг, 0,045 мг/кг, 0,0475 мг/кг, 0,05 мг/кг,

0,0525 мг/кг, 0,055 мг/кг, 0,0575 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,0625 мг/кг, 0,065 мг/кг, 0,0675 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,0725 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,0775 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,0825 мг/кг, 0,085 мг/кг, 0,0875 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,0925 мг/кг, 0,095 мг/кг, 0,0975 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,125 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,175 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,225 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,275 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,325 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,375 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,425 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,475 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг. Значения, промежуточные по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Доза средства для RNAi, которую вводят субъекту, может быть подобрана с уравниванием риска и пользы определенной дозы, например, для достижения необходимого уровня супрессии гена *Serpinal* (который определяют, например, исходя из супрессии mRNA *Serpinal*, экспрессии белка *Serpinal*) или необходимого терапевтического или профилактического эффекта, вместе с тем одновременно избегая нежелательных побочных эффектов.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. При необходимости облегчить проведение повторяющихся или частых инфузий может быть целесообразной имплантация устройства для доставки, например, насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутрибрюшинного, интракостерального или внутрисуставного) или емкости. В некоторых вариантах осуществления число или количество последовательных доз зависит от достижения необходимого эффекта, например, супрессии гена *Serpinal*, или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, уменьшения симптома болезни печени. Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi вводят в соответствии со схемой. Например, средство для RNAi можно вводить один 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, каждый час, каждые четыре часа, каждые шесть часов, каждые восемь часов, каждые

двенадцать часов, каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц. Согласно другим вариантам осуществления схема предусматривает введения с небольшими интервалами с последующим более длительным периодом времени, в течение которого средство не вводят. Например, схема может включать первоначальный набор доз, которые вводят в течение относительно короткого периода времени (например, приблизительно каждые 6 часов, приблизительно каждые 12 часов, приблизительно каждые 24 часа, приблизительно каждые 48 часов или приблизительно каждые 72 часа) с последующим более длительным периодом времени (например, приблизительно 1 неделя, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель или приблизительно 8 недель), в течение которого средство для RNAi не вводят. Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi первоначально вводят каждый час, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц). Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi первоначально вводят ежедневно, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц). Согласно некоторым вариантам осуществления более длительный интервал увеличивается со временем, или его определяют, исходя из достижения необходимого действия. Согласно конкретному варианту осуществления средство для RNAi вводят один раз в день в течение первой недели с последующим введением доз один раз в неделю, начиная с восьмого дня введения. Согласно другому конкретному варианту осуществления средство для RNAi вводят через день в течение первой недели с последующим введением доз один раз в неделю, начиная с восьмого дня введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления средство для RNAi вводят при режиме дозирования, который включает "фазу насыщения" из введений с небольшими интервалами, за которой

может следовать "фаза поддержания", в которой средство для RNAi вводят с более длительными интервалами. Согласно одному варианту осуществления фаза насыщения включает пять ежедневных введений средства для RNAi в течение первой недели. Согласно другому варианту осуществления фаза поддержания включает введения средства для RNAi один или два раза в неделю. В дополнительном варианте осуществления фаза поддержания длится 5 недель. Согласно одному варианту осуществления фаза насыщения включает введение дозы 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг пять раз в неделю. Согласно другому варианту осуществления фаза поддержания предусматривает введение дозы 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг один раз или два раза в неделю.

Любую из этих схем необязательно можно повторять с обеспечением одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения необходимого эффекта, например, супрессии гена *Serpinal1*, и/или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, уменьшения симптома ассоциированного с *Serpinal1* заболевания, например, болезни печени.

В другом аспекте в настоящем изобретении описан способ инструктирования конечного пользователя, например лица, осуществляющего уход или лечение, или субъекта, в отношении того, как вводить средство на основе iRNA, описанное в данном документе. Способ включает, необязательно, предоставление конечному пользователю одной или нескольких доз средства, представляющего собой iRNA, и инструктирование конечного пользователя по введению средства, представляющего собой iRNA, в режиме, описанном в данном документе, таким образом, инструктируя конечного пользователя.

Наследственная предрасположенность играет роль в развитии заболеваний, ассоциированных с целевым геном, например, болезни печени. Таким образом, пациента, нуждающегося в siRNA, можно выявить путем анализа семейного анамнеза или, например, тестирования на наличие одного или нескольких генетических маркеров или вариантов. Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента

посредством выбора пациента исходя из того, что у пациента имеется одна или несколько дефектных форм *Serpinal* или дефектный вариант гена *Serpinal*, например, аллель PIZ, PIS или PIM(Malton). Способ предусматривает введение пациенту средства на основе iRNA в терапевтически эффективном количестве.

Медицинский работник, такой как врач, медицинская сестра, или член семьи могут принять во внимание семейный анамнез перед назначением или введением средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению. Кроме того, можно выполнить анализ для определения генотипа или фенотипа. Например, можно выполнить ДНК-анализ с образцом от пациента, например, образцом крови, для установления генотипа и/или фенотипа по *Serpinal* перед введением пациенту dsRNA к *Serpinal*.

VI. Наборы

Настоящее изобретение также предусматривает наборы для применения любого из средств на основе iRNA и/или осуществления любого из способов согласно настоящему изобретению. Такие наборы включают одно или несколько средств для RNAi и инструкции по применению, например, инструкции для ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке, путем приведения клетки в контакт со средством(средствами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии *Serpinal*. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для приведения клетки в контакт со средством для RNAi (например, устройство для инъекции) или средства для определения степени ингибирования *Serpinal* (например, средства для определения степени ингибирования mRNA *Serpinal*). Такие средства для определения степени ингибирования *Serpinal* могут предусматривать средства для получения образца от субъекта, как, например, образец плазмы. Наборы согласно настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для введения средства(средств) для RNAi субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

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 посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта, настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Следующие материалы и способы использовали в примерах.

Конструирование siRNA

Ген *Serpinal* характеризуется несколькими альтернативными транскриптами. Конструирование siRNA выполняли для выявления siRNA, нацеливающихся на все транскрипты *Serpinal* человека и макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*; в дальнейшем "суно"), аннотированные в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Использовали следующие транскрипты человека из коллекции эталонных последовательностей в NCBI: человек - NM_000295.4, NM_001002235.2, NM_001002236.2, NM_001127700.1, NM_001127701.1, NM_001127702.1, NM_001127703.1, NM_001127704.1, NM_001127705.1, NM_001127706.1, NM_001127707.1. Для выявления транскрипта суно, транскрипт макака-резуса (*Macaca mulatta*), XM_001099255.2, выравнивали с геномом *M. fascicularis* с использованием инструмента для выравнивания Spide (www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/). Общая процентная идентичность транскриптов резуса и суно составляла 99,6%. Транскрипт суно собирали вручную с сохранением консенсусных сайтов сплайсинга, а также кодирующих и нетранслируемых областей полной длины. Длина полученного в результате транскрипта составляла 2064 нуклеотида.

Все дуплексы siRNA сконструировали так, что они были на 100% идентичными всем перечисленным транскриптам человека и *супо*.

Пятьсот восемьдесят пять кандидатных siRNA использовали в обширном поиске в отношении транскриптома человека (определенные как набор из записей NM_ и XM_ в пределах набора эталонных последовательностей человека в NCBI). Синтезировали олигонуклеотиды siRNA, полученные в общей сложности из 48 смысловых (21-мерных) и 48 антисмысловых (23-мерных) последовательностей, и образовывали дуплексы. Детальный перечень последовательностей смысловой и антисмысловой нити *Serpin1* представлен в таблицах 1 и 2.

Синтез siRNA

I. Общая методика синтеза РНК в небольшом и среднем масштабе

Олигонуклеотиды РНК синтезировали в масштабе 0,2–500 мкмоль с использованием коммерчески доступных 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-O-трет-бутилдиметилсилил-3'-O-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил) фосфораидитных мономеров уридина, 4-N-ацетилцитидина, 6-N-бензоиладенозина, и 2-N-изобутирилгуанозина, и соответствующих 2'-O-метил- и 2'-фторфосфораидитов в соответствии со стандартными протоколами твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Растворы аидитов получали при концентрации 0,1–0,15 М, и при этом 5-этилтио-1Н-тетразол (0,25–0,6 М в ацетонитриле) использовали в качестве активатора. Модификации фосфоротиоатных скелетов вводили в ходе синтеза с использованием 0,2 М фенилацетилдисульфида (PADS) в лутидине:ацетонитриле (1:1) (объем;объем) или 0,1 М 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тиона (DDTT) в пиридине для стадии окисления. После завершения синтеза последовательности отщепляли от твердой подложки и снимали защиту при помощи метиламина с последующим триэтиламин.3НF для удаления любых присутствующих 2'-O-трет-бутилдиметилсилильных защитных групп.

Для синтеза в масштабе 5–500 мкмоль и полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор и/или 2'-O-метил

или их комбинации) с олигонуклеотидов снимали защиту с использованием 3:1 (объем/объем) этанола и концентрированного (28–32%) водного раствора аммиака либо при 35°C в течение 16 ч, либо при 55°C в течение 5,5 ч. Перед снятием защиты с использованием аммиака олигонуклеотиды обрабатывали 0,5 М пиперидином в ацетонитриле в течение 20 мин. на твердой подложке. Неочищенные олигонуклеотиды анализировали при помощи LC-MS и анионообменной HPLC (IEX-HPLC). Очистку олигонуклеотидов осуществляли при помощи IEX HPLC с использованием: 20 мМ фосфата, 10%–15% ACN, pH=8,5 (буфер А) и 20 мМ фосфата, 10%–15% ACN, 1 М NaBr, pH=8,5 (буфер В). Анализировали чистоту фракций при помощи аналитической HPLC. Фракции, содержащие продукт с подходящей чистотой, объединяли и концентрировали на роторном испарителе перед обессаливанием. Образцы обессаливали при помощи эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали досуха. Осуществляли гибридизацию одинаковых молярных количеств смысловых и антисмысловых нитей в 1х буфере PBS с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Синтез в небольшом масштабе (0,2–1 мкмоль) осуществляли на синтезаторе MerMade 192 в 96-луночном формате. В случае полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор, и/или 2'-О-метил, или их комбинаций) с олигонуклеотидов снимали защиту с использованием метиламина при комнатной температуре в течение 30–60 мин. с последующей инкубацией при 60°C в течение 30 мин. или с использованием 3:1 (объем/объем) этанола и концентрированного (28–32%) водного раствора аммиака при комнатной температуре в течение 30–60 мин. с последующей инкубацией при 40°C в течение 1,5 часа. Неочищенные олигонуклеотиды затем осаждали в растворе ацетонитрил:ацетон (9:1) и выделяли посредством центрифугирования и декантирования супернатанта. Осадок неочищенных олигонуклеотидов ресуспендировали в 20 мМ буфере NaOAc и анализировали при помощи LC-MS и анионообменной HPLC. Неочищенные последовательности олигонуклеотидов обессаливали в планшетах с 96 глубокими лунками на 5 мл колонке HiTrap Sephadex G25 (GE

Healthcare). В каждой лунке получали приблизительно 1,5 мл образцов, соответствующих отдельной последовательности. Эти очищенные обессоленные олигонуклеотиды анализировали при помощи LC-MS и анионообменной хроматографии. Дуплексы получали путем гибридизации эквимольных количеств смысловых и антисмысловых последовательностей при помощи автоматического устройства Tecan. Концентрацию дуплексов довели до 10 мкМ в буфере 1x PBS.

II. Синтез олигонуклеотидов, конъюгированных с GalNAc, для *in vivo* анализа

Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандом GalNAc по их 3'-концу, синтезировали в масштабе 0,2–500 мкмоль с использованием твердой подложки, предварительно загруженной Y-образным линкером, несущим защищенную 4,4'-диметокситритилом (DMT) первичную гидроксильную группу, для синтеза олигонуклеотидов и лигандом GalNAc, прикрепленным посредством связывающего фрагмента.

Для синтеза конъюгатов с GalNAc в масштабе 5–500 мкмоль следовали изложенному выше протоколу синтеза для РНК со следующими модификациями. В случае подложек для синтеза на основе полистирола использовали 5% дихлоруксусную кислоту в толуоле для расщепления DMT в ходе синтеза. Отщепление от подложки и снятие защиты осуществляли так, как описано выше. Последовательности, богатые фосфоротиоатами (обычно > 5 фосфоротиоатов), синтезировали без удаления концевой группы 5'-DMT ("с DMT") и после отщепления и снятия защиты, как описано выше, очищали при помощи обращенно-фазовой HPLC с использованием 50 мМ ацетата аммония в воде (буфер А) и 50 мМ ацетата аммония в 80% ацетонитриле (буфер В). Анализировали чистоту фракций при помощи аналитической HPLC и/или LC-MS. Фракции, содержащие продукт с подходящей чистотой, объединяли и концентрировали на роторном испарителе. DMT-группу удаляли с использованием 20%–25% уксусной кислоты в воде до завершения. Образцы обессаливали при помощи эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали досуха. Осуществляли гибридизацию одинаковых молярных количеств смысловых и антисмысловых нитей в 1x буфере

PBS с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Для синтеза конъюгатов с GalNAc (0,2-1 мкмоль) в небольшом масштабе, в том числе последовательностей с несколькими фосфоротиоатными связями, применяли протоколы, описанные выше для синтеза РНК или последовательностей, полностью содержащих 2'-F/2'-OMe, на платформе MerMade. Синтез осуществляли с использованием предварительно заполненных колонок, содержащих функционализированную GalNAc стеклянную подложку с регулируемыми порами.

Синтез кДНК 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 РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли к 10 мкл общей РНК. кДНК 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.

Клеточная культура и трансфекции

Клетки Нер3В, НерG2 или HeLa (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конфлюентности при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в рекомендованной среде (ATCC), дополненной 10% FBS и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Для дуплексов, скрининг которых проводили в 96-луночном формате, трансфекцию выполняли путем добавления 44,75 мкл Opti-MEM с 0,25 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 15 минут. Пятьдесят мкл полной питательной среды без антибиотика, содержащей $\sim 2 \times 10^4$ клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Для дуплексов, скрининг которых проводили в 384-луночном формате, 5 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) смешивали с 5 мкл каждого дуплекса siRNA на отдельную лунку.

Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим добавлением 40 мкл полной питательной среды без антибиотика, содержащей $\sim 8 \times 10^3$ клеток. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. 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.

Трансфекция посредством свободного поглощения

Пять мкл каждой конъюгированной с GalNac siRNA в PBS объединяли с 3×10^4 свежеразмороженных криосохраненных гепатоцитов макаков-крабоедов (In Vitro Technologies-Celsis, Балтимор, Мэриленд; № партии JQD), ресуспендированных в 95 мкл среды "In Vitro Gro CP media" (In Vitro Technologies-Celsis, Балтимор, Мэриленд), в каждой лунке 96-луночного планшета, или использовали 5 мкл siRNA и 45 мкл среды, содержащей $1,2 \times 10^3$ клеток, для формата 384-луночного планшета. Смесь инкубировали в течение приблизительно 24 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. siRNA тестировали при конечных концентрациях 500 нМ и 10 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора "DYNABEADS mRNA Isolation Kit" (Invitrogen, номер по каталогу 610-12)

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем перемешивали в течение 5 минут при 850 об./мин. с помощью Eppendorf 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 минуты. 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 минут. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и перемешивали в течение 1 минуты. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В,

фиксируют и супернатант удаляют. Гранулы затем промывают 150 мкл элюирующего буфера, фиксируют и супернатант удаляют. Гранулам дают возможность высохнуть в течение 2 минут. После высыхания добавляют 50 мкл элюирующего буфера и перемешивают в течение 5 минут при 70°C. Гранулы фиксируют на магните в течение 5 минут. Удаляют пятьдесят мкл супернатанта и добавляют в другой 96-луночный планшет.

Для 384-луночного формата клетки лизируют в течение одной минуты путем добавления 50 мкл лизирующего/связывающего буфера. Применяют два мкл магнитных гранул на лунку. Необходимый объем гранул делят на aliquоты, фиксируют на магнитном стенде и удаляют раствор для хранения гранул. Гранулы затем ресуспендируют в необходимом объеме лизирующего/связывающего буфера (25 мкл на лунку), и при этом 25 мкл суспензии с гранулами добавляют к лизированным клеткам. Смесь лизата и гранул инкубируют в течение 10 минут на VibraTransaltor при параметре №7 (UnionScientific Corp., Рэндоллстаун, Мэриленд). Впоследствии гранулы фиксируют при помощи магнитного стенда, супернатант удаляют и гранулы промывают один раз 90 мкл буфера А с последующими отдельными стадиями промывания 90 мкл буфера В и 100 мкл элюирующего буфера. Гранулы пропитывают каждым промывочным буфером в течение ~1 минуты (без использования смешивания). После конечной стадии промывания гранулы ресуспендируют в 15 мкл элюирующего буфера в течение 5 минут при 70°C с последующим фиксированием гранул и удалением супернатанта (до 8 мкл) для синтеза кДНК и/или хранения очищенной РНК (-20°C).

PCR в режиме реального времени

Два мкл кДНК добавляют к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для SERPINA1 (Applied Biosystems, № по кат. Hs00165475_m1) для экспериментов с использованием Her3B или разработанных по заказу анализов taqman в отношении GAPDH и SERPINA1 для экспериментов с использованием PCH, и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler

480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени осуществляли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере в двух независимых трансфекциях с двумя биологическими повторностями в каждой, и при этом каждую трансфекцию анализировали в двух повторностях.

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением способа $\Delta\Delta Ct$ и нормализовали в соответствии с данными анализов, выполненных с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или клетками с имитацией трансфекции. Для анализов со свободным поглощением данные нормализовали в соответствии с данными для клеток, обработанных PBS или GalNAc-1955 (самая высокая используемая концентрация для экспериментальных соединений). IC50 вычисляли 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 следующими. СМЫСЛОВАЯ: 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 33), и АНТИСМЫСЛОВАЯ: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 40).

Использовали следующие праймеры и зонды Taqman:

Праймеры и зонды TaqMan для Serpinal макака-крабоеда и Gapdh.

Serpinal Прямой праймер: ACTAAGGTCTTCAGCAATGGG (SEQ ID NO:34); обратный праймер: GCTTCAGTCCCTTTCTCATCG (SEQ ID NO:35); зонд Taqman: TGGTCAGCACAGCCTTATGCACG (SEQ ID NO:36)

Gapdh Прямой праймер: GCATCCTGGGCTACACTGA (SEQ ID NO:37); обратный праймер: TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO:38); зонд Taqman: CCAGGTGGTCTCCTCC (SEQ ID NO:39).

Таблица В

Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты

Сокращение	Нуклеотид (ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
dT	2'-дезокситимидин
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфоротиоат

dU	2`-дезоксиуридин
s	фосфоротиаатная связь
L96	N-[трис (GalNAc-алкил) -амидодеканоил] -4- гидроксипролинол-Нур- (GalNAc-алкил) 3
I	инозин-3`-фосфат
Is	инозин-3`-фосфоротиаат
dI	2`-дезоксирибоинозин
dIs	2`-дезоксиинозин-3`-фосфоротиаат
Y34	2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3- фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе- фураноза)
Y34s	2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3- фосфоротиаат (лишенная азотистого основания 2'- ОМе-фураноза)
P	5'-фосфат

Пример 1. Синтез конъюгированных с GalNAc олигонуклеотидов

Ряд дуплексов siRNA, охватывающих последовательность mRNA *Serpinal1*, конструировали, синтезировали и конъюгировали с трехвалентным GalNAc по 3-концу смысловой нити с применением методик, описанных выше. Последовательности таких дуплексов показаны в таблице 1. Такие же последовательности также синтезировали с различными нуклеотидными модификациями и конъюгировали с трехвалентным GalNAc. Последовательности модифицированных дуплексов показаны в таблице 2.

Таблица 1

Немодифицированные последовательности Serpinal

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая транс. посл.	SEQ ID NO:	Положение в NM_000295.4	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая транс. последовательность	SEQ ID NO:	Положение в NM_000295.4
AD-58681.1	A-119065.1	GUCCAACAGCACC AAUAUCUU	41	469-489	A-119066.1	AAGAUUUUGGUGCUG UUGGACUG	129	467-489
AD-59084.1	A-119065.2	GUCCAACAGCACC AAUAUCUU	42	469-489	A-119941.1	AAGAUUUUGGUGCUG UUGGACUG	130	467-489
AD-59060.2	A-119933.1	UAAUGAUUGAAC AAAAUACCA	43	1455-1475	A-119934.1	UGGUUUUUUGUUCAA UCAUUAAG	131	1453-1475
AD-59060.1	A-119933.1	UAAUGAUUGAAC AAAAUACCA	44	1455-1475	A-119934.1	UGGUUUUUUGUUCAA UCAUUAAG	132	1453-1475
AD-59054.2	A-119931.1	CUUCUUAUGAU UGAACAAAA	45	1450-1470	A-119932.1	UUUUGUUCAAUCAU AAGAAGAC	133	1448-1470
AD-59054.1	A-119931.1	CUUCUUAUGAU UGAACAAAA	46	1450-1470	A-119932.1	UUUUGUUCAAUCAU AAGAAGAC	134	1448-1470
AD-59072.2	A-119937.1	AUUGAACAAAAU ACCAAGUCU	47	1460-1480	A-119938.1	AGACUUGGUUUUUUG UUCAAUCA	135	1458-1480
AD-59072.1	A-119937.1	AUUGAACAAAAU ACCAAGUCU	48	1460-1480	A-119938.1	AGACUUGGUUUUUUG UUCAAUCA	136	1458-1480
AD-59048.2	A-119929.1	UUCUUAUGAUU GAACAAAAU	49	1451-1471	A-119930.1	AUUUUGUUCAAUCAU UAAGAAGA	137	1449-1471
AD-59048.1	A-119929.1	UUCUUAUGAUU GAACAAAAU	50	1451-1471	A-119930.1	AUUUUGUUCAAUCAU UAAGAAGA	138	1449-1471
AD-59062.2	A-119964.1	CAAACCCUUUGUC UUCUUAUU	51	1438-1458	A-119965.1	AUUAAGAAGACAAAG GGUUUGUU	139	1436-1458

AD-59062.1	A-119964.1	CAAACCCUUUGUC UUCUUAU	52	1438-1458	A-119965.1	AUUAAGAAGACAAAG GGUUUGUU	140	1436-1458
AD-59078.2	A-119939.1	UGUCUUCUUAU GAUUGAACA	53	1447-1467	A-119940.1	UGUUCAAUCAUUAAG AAGACAAA	141	1445-1467
AD-59078.1	A-119939.1	UGUCUUCUUAU GAUUGAACA	54	1447-1467	A-119940.1	UGUUCAAUCAUUAAG AAGACAAA	142	1445-1467
AD-59056.2	A-119962.1	CACCUGGAAAAU GAACUCACC	55	1121-1141	A-119963.1	GGUGAGUUCAUUUUC CAGGUGCU	143	1119-1141
AD-59056.1	A-119962.1	CACCUGGAAAAU GAACUCACC	56	1121-1141	A-119963.1	GGUGAGUUCAUUUUC CAGGUGCU	144	1119-1141
AD-59091.2	A-119958.1	UUUUGCUCUGGU GAAUUAU	57	880-900	A-119959.1	AUGUAAUUCACCAGA GCAAAAAC	145	878-900
AD-59091.1	A-119958.1	UUUUGCUCUGGU GAAUUAU	58	880-900	A-119959.1	AUGUAAUUCACCAGA GCAAAAAC	146	878-900
AD-59083.2	A-120018.1	ACCCUUUGUCUUC UUA AUGAU	59	1441-1461	A-120019.1	AUCAUUAAGAAGACA AAGGGUUU	147	1439-1461
AD-59083.1	A-120018.1	ACCCUUUGUCUUC UUA AUGAU	60	1441-1461	A-120019.1	AUCAUUAAGAAGACA AAGGGUUU	148	1439-1461
AD-59073.2	A-119952.1	UUGAACAAAAUA CCAAGUCUC	61	1461-1481	A-119953.1	GAGACUUGGUUUUU GUUCAUC	149	1459-1481
AD-59073.1	A-119952.1	UUGAACAAAAUA CCAAGUCUC	62	1461-1481	A-119953.1	GAGACUUGGUUUUU GUUCAUC	150	1459-1481
AD-59066.2	A-119935.1	GUUCAACAAACCC UUUGUCUU	63	1432-1452	A-119936.1	AAGACAAAGGGUUUG UUGAACUU	151	1430-1452
AD-59066.1	A-119935.1	GUUCAACAAACCC UUUGUCUU	64	1432-1452	A-119936.1	AAGACAAAGGGUUUG UUGAACUU	152	1430-1452

AD-59059.2	A-120010.1	AAAUACCAAGUC UCCCCUCUU	65	1468-1488	A-120011.1	AAGAGGGGAGACUUG GUUUUUUG	153	1466-1488
AD-59059.1	A-120010.1	AAAUACCAAGUC UCCCCUCUU	66	1468-1488	A-120011.1	AAGAGGGGAGACUUG GUUUUUUG	154	1466-1488
AD-59070.2	A-119998.1	UUUUUGCUCUGG UGAAUUACA	67	879-899	A-119999.1	UGUAAUUCACCAGAG CAAAAACU	155	877-899
AD-59070.1	A-119998.1	UUUUUGCUCUGG UGAAUUACA	68	879-899	A-119999.1	UGUAAUUCACCAGAG CAAAAACU	156	877-899
AD-59063.2	A-119980.1	AGUUCAACAAACC CUUUGUCU	69	1431-1451	A-119981.1	AGACAAAGGGUUUGU UGAACUUG	157	1429-1451
AD-59063.1	A-119980.1	AGUUCAACAAACC CUUUGUCU	70	1431-1451	A-119981.1	AGACAAAGGGUUUGU UGAACUUG	158	1429-1451
AD-59069.2	A-119982.1	AAUGAUUGAACA AAAUACCAA	71	1456-1476	A-119983.1	UUGGUUUUUUGUUA AUCAUUAA	159	1454-1476
AD-59069.1	A-119982.1	AAUGAUUGAACA AAAUACCAA	72	1456-1476	A-119983.1	UUGGUUUUUUGUUA AUCAUUAA	160	1454-1476
AD-59082.2	A-120002.1	UACUGGAACCUA UGAUCUGAA	73	1216-1236	A-120003.1	UUCAGAUCAUAGGUU CCAGUAAU	161	1214-1236
AD-59082.1	A-120002.1	UACUGGAACCUA UGAUCUGAA	74	1216-1236	A-120003.1	UUCAGAUCAUAGGUU CCAGUAAU	162	1214-1236
AD-59088.2	A-120004.1	ACAUUAAAGAAG GGUUGAGCU	75	1576-1596	A-120005.1	AGCUCAACCCUUCUU UAAUGUCA	163	1574-1596
AD-59088.1	A-120004.1	ACAUUAAAGAAG GGUUGAGCU	76	1576-1596	A-120005.1	AGCUCAACCCUUCUU UAAUGUCA	164	1574-1596
AD-59080.2	A-119970.1	AAAAUUGUGGAU UUGGUCAAG	77	839-859	A-119971.1	CUUGACCAAAUCCAC AAUUUUCC	165	837-859

AD-59080.1	A-119970.1	AAAAUUGUGGAU UUGGUCAAG	78	839-859	A-119971.1	CUUGACCAAUCCAC AAUUUUCC	166	837-859
AD-59058.2	A-119994.1	AUUACUGGAACC UAUGAUCUG	79	1214-1234	A-119995.1	CAGAUCAUAGGUUCC AGUAAUGG	167	1212-1234
AD-59058.1	A-119994.1	AUUACUGGAACC UAUGAUCUG	80	1214-1234	A-119995.1	CAGAUCAUAGGUUCC AGUAAUGG	168	1212-1234
AD-59090.2	A-119942.1	CACAGUUUUUGC UCUGGUGAA	81	874-894	A-119943.1	UUCACCAGAGCAAAA ACUGUGUC	169	872-894
AD-59090.1	A-119942.1	CACAGUUUUUGC UCUGGUGAA	82	874-894	A-119943.1	UUCACCAGAGCAAAA ACUGUGUC	170	872-894
AD-59057.2	A-119978.1	UUAAAGAAGGGU UGAGCUGGU	83	1579-1599	A-119979.1	ACCAGCUCAACCCUU CUUUAAUG	171	1577-1599
AD-59057.1	A-119978.1	UUAAAGAAGGGU UGAGCUGGU	84	1579-1599	A-119979.1	ACCAGCUCAACCCUU CUUUAAUG	172	1577-1599
AD-59051.2	A-119976.1	AGUGAGCAUCGC UACAGCCUU	85	499-519	A-119977.1	AAGGCUGUAGCGAUG CUCACUGG	173	497-519
AD-59051.1	A-119976.1	AGUGAGCAUCGC UACAGCCUU	86	499-519	A-119977.1	AAGGCUGUAGCGAUG CUCACUGG	174	497-519
AD-59065.2	A-120012.1	AAGGAGCUUGAC AGAGACACA	87	857-877	A-120013.1	UGUGUCUCUGUCAAG CUCCUUGA	175	855-877
AD-59065.1	A-120012.1	AAGGAGCUUGAC AGAGACACA	88	857-877	A-120013.1	UGUGUCUCUGUCAAG CUCCUUGA	176	855-877
AD-59087.2	A-119988.1	GUGGAUAAGUUU UUGGAGGAU	89	716-736	A-119989.1	AUCCUCCAAAAACUU AUCCACUA	177	714-736
AD-59087.1	A-119988.1	GUGGAUAAGUUU UUGGAGGAU	90	716-736	A-119989.1	AUCCUCCAAAAACUU AUCCACUA	178	714-736

AD-59075.2	A-119984.1	GAUUGAACAAAA UACCAAGUC	91	1459-1479	A-119985.1	GACUUGGUAUUUUGU UCAAUCAU	179	1457-1479
AD-59075.1	A-119984.1	GAUUGAACAAAA UACCAAGUC	92	1459-1479	A-119985.1	GACUUGGUAUUUUGU UCAAUCAU	180	1457-1479
AD-59092.2	A-119974.1	GCUCUCCAAGGCC GUGCAUAA	93	1321-1341	A-119975.1	UUAUGCACGGCCUUG GAGAGCUU	181	1319-1341
AD-59092.1	A-119974.1	GCUCUCCAAGGCC GUGCAUAA	94	1321-1341	A-119975.1	UUAUGCACGGCCUUG GAGAGCUU	182	1319-1341
AD-59081.2	A-119986.1	ACCUGGAAAAUG AACUCACCC	95	1122-1142	A-119987.1	GGGUGAGUUCAUUUU CCAGGUGC	183	1120-1142
AD-59081.1	A-119986.1	ACCUGGAAAAUG AACUCACCC	96	1122-1142	A-119987.1	GGGUGAGUUCAUUUU CCAGGUGC	184	1120-1142
AD-59064.2	A-119996.1	GGGACCAAGGCU GACACUCAC	97	536-556	A-119997.1	GUGAGUGUCAGCCUU GGUCCCCA	185	534-556
AD-59064.1	A-119996.1	GGGACCAAGGCU GACACUCAC	98	536-556	A-119997.1	GUGAGUGUCAGCCUU GGUCCCCA	186	534-556
AD-59052.2	A-119992.1	GCCAUGUUUUUA GAGGCCAUA	99	1385-1405	A-119993.1	UAUGGCCUCUAAAAA CAUGGCCC	187	1383-1405
AD-59052.1	A-119992.1	GCCAUGUUUUUA GAGGCCAUA	100	1385-1405	A-119993.1	UAUGGCCUCUAAAAA CAUGGCCC	188	1383-1405
AD-59076.2	A-120000.1	CCUGGAAAAUGA ACUCACCCA	101	1123-1143	A-120001.1	UGGGUGAGUUCAUUU UCCAGGUG	189	1121-1143
AD-59076.1	A-120000.1	CCUGGAAAAUGA ACUCACCCA	102	1123-1143	A-120001.1	UGGGUGAGUUCAUUU UCCAGGUG	190	1121-1143
AD-59068.2	A-119966.1	AAGAGGCCAAGA AACAGAUCA	103	789-809	A-119967.1	UGAUCUGUUUCUUGG CCUCUUCG	191	787-809

AD-59068.1	A-119966.1	AAGAGGCCAAGA AACAGAUCA	104	789-809	A-119967.1	UGAUCUGUUUCUUGG CCUCUUCG	192	787-809
AD-59089.2	A-120020.1	GGCAAAUGGGAG AGACCCUUU	105	911-931	A-120021.1	AAAGGGUCUCUCCCA UUUGCCUU	193	909-931
AD-59089.1	A-120020.1	GGCAAAUGGGAG AGACCCUUU	106	911-931	A-120021.1	AAAGGGUCUCUCCCA UUUGCCUU	194	909-931
AD-59093.2	A-119990.1	UGGGAAAAGUGG UGAAUCCCA	107	1491-1511	A-119991.1	UGGGAUUCACCACUU UUCCCAUG	195	1489-1511
AD-59093.1	A-119990.1	UGGGAAAAGUGG UGAAUCCCA	108	1491-1511	A-119991.1	UGGGAUUCACCACUU UUCCCAUG	196	1489-1511
AD-59061.2	A-119948.1	GGGGACCAAGGC UGACACUCA	109	535-555	A-119949.1	UGAGUGUCAGCCUUG GUCCCCAG	197	533-555
AD-59061.1	A-119948.1	GGGGACCAAGGC UGACACUCA	110	535-555	A-119949.1	UGAGUGUCAGCCUUG GUCCCCAG	198	533-555
AD-59074.2	A-119968.1	GACAUUAAAGAA GGGUUGAGC	111	1575-1595	A-119969.1	GCUCAACCCUUCUUU AAUGUCAU	199	1573-1595
AD-59074.1	A-119968.1	GACAUUAAAGAA GGGUUGAGC	112	1575-1595	A-119969.1	GCUCAACCCUUCUUU AAUGUCAU	200	1573-1595
AD-59079.2	A-119954.1	GGCCAUGUUUUU AGAGGCCAU	113	1384-1404	A-119955.1	AUGGCCUCUAAAAAC AUGGCCCC	201	1382-1404
AD-59079.1	A-119954.1	GGCCAUGUUUUU AGAGGCCAU	114	1384-1404	A-119955.1	AUGGCCUCUAAAAAC AUGGCCCC	202	1382-1404
AD-59071.2	A-120014.1	UUCCUGCCUGAUG AGGGGAAA	115	1094-1114	A-120015.1	UUUCCCCUCAUCAGG CAGGAAGA	203	1092-1114
AD-59071.1	A-120014.1	UUCCUGCCUGAUG AGGGGAAA	116	1094-1114	A-120015.1	UUUCCCCUCAUCAGG CAGGAAGA	204	1092-1114

AD-59086.2	A-119972.1	CUCUCCAAGGCCG UGCAUAAG	117	1322-1342	A-119973.1	CUUAUGCACGGCCUU GGAGAGCU	205	1320-1342
AD-59086.1	A-119972.1	CUCUCCAAGGCCG UGCAUAAG	118	1322-1342	A-119973.1	CUUAUGCACGGCCUU GGAGAGCU	206	1320-1342
AD-59094.2	A-120006.1	AGCUCUCCAAGGC CGUGCAUA	119	1320-1340	A-120007.1	UAUGCACGGCCUUGG AGAGCUUC	207	1318-1340
AD-59094.1	A-120006.1	AGCUCUCCAAGGC CGUGCAUA	120	1320-1340	A-120007.1	UAUGCACGGCCUUGG AGAGCUUC	208	1318-1340
AD-59085.2	A-119956.1	UCCUGGAGGGCCU GAAUUUCA	121	564-584	A-119957.1	UGAAAUUCAGGCCC CCAGGAUU	209	562-584
AD-59085.1	A-119956.1	UCCUGGAGGGCCU GAAUUUCA	122	564-584	A-119957.1	UGAAAUUCAGGCCC CCAGGAUU	210	562-584
AD-59067.2	A-119950.1	UUGGUCAAGGAG CUUGACAGA	123	851-871	A-119951.1	UCUGUCAAGCUCCU GACCAAU	211	849-871
AD-59067.1	A-119950.1	UUGGUCAAGGAG CUUGACAGA	124	851-871	A-119951.1	UCUGUCAAGCUCCU GACCAAU	212	849-871
AD-59053.2	A-120008.1	UUUGGUCAAGGA GCUUGACAG	125	850-870	A-120009.1	CUGUCAAGCUCCU ACCAAUC	213	848-870
AD-59053.1	A-120008.1	UUUGGUCAAGGA GCUUGACAG	126	850-870	A-120009.1	CUGUCAAGCUCCU ACCAAUC	214	848-870
AD-59077.2	A-120016.1	UCCCCAGUGAGCA UCGCUACA	127	494-514	A-120017.1	UGUAGCGAUGCUCAC UGGGGAGA	215	492-514
AD-59077.1	A-120016.1	UCCCCAGUGAGCA UCGCUACA	128	494-514	A-120017.1	UGUAGCGAUGCUCAC UGGGGAGA	216	492-514

Таблица 2

Serpinal - модифицированные последовательности

Название дуплека	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смыслового олигонуклеотида	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмыслового олигонуклеотида	SEQ ID NO:
AD- 58681.1	A-119065.1	GfsusCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96	217	A-119066.1	asAfsgAfuAfuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsUfsg	305
AD- 59084.1	A-119065.2	GfsusCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96	218	A-119941.1	asAfsgAfuAfuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsusg	306
AD- 59060.2	A-119933.1	UfsasAfuGfaUfuGfAfAfcAfaAfaUfaCfcAfL96	219	A-119934.1	usGfsgUfaUfuUfuGfuucAfaUfcAfuUfasasg	307
AD- 59060.1	A-119933.1	UfsasAfuGfaUfuGfAfAfcAfaAfaUfaCfcAfL96	220	A-119934.1	usGfsgUfaUfuUfuGfuucAfaUfcAfuUfasasg	308
AD- 59054.2	A-119931.1	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfaCfaAfaAfL96	221	A-119932.1	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	309
AD- 59054.1	A-119931.1	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfaCfaAfaAfL96	222	A-119932.1	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	310
AD- 59072.2	A-119937.1	AfsusUfgAfaCfaAfAfAfuAfcCfaAfgUfcUfL96	223	A-119938.1	asGfsaCfuUfgGfuAfuuuUfgUfuCfaAfuscsa	311
AD- 59072.1	A-119937.1	AfsusUfgAfaCfaAfAfAfuAfcCfaAfgUfcUfL96	224	A-119938.1	asGfsaCfuUfgGfuAfuuuUfgUfuCfaAfuscsa	312
AD- 59048.2	A-119929.1	UfsusCfuUfaAfuGfAfUfuGfaAfcAfaAfaUfL96	225	A-119930.1	asUfsuUfuGfuUfcAfaucAfuUfaAfgAfasgsa	313
AD- 59048.1	A-119929.1	UfsusCfuUfaAfuGfAfUfuGfaAfcAfaAfaUfL96	226	A-119930.1	asUfsuUfuGfuUfcAfaucAfuUfaAfgAfasgsa	314
AD- 59062.2	A-119964.1	CfsasAfaCfcCfuUfUfGfuCfuUfcUfuAfaUfL96	227	A-119965.1	asUfsuAfaGfaAfgAfcaaAfgGfgUfuUfgsusu	315

AD-59062.1	A-119964.1	CfsasAfaCfcCfuUfUfGfuCfuUfcUfuAfaUfL96	228	A-119965.1	asUfsuAfaGfaAfgAfcaaAfgGfgUfuUfgsusu	316
AD-59078.2	A-119939.1	UfsgsUfcUfuCfuUfAfAfuGfaUfuGfaAfcAfL96	229	A-119940.1	usGfsuUfcAfaUfcAfuaaAfgAfaGfaCfasasa	317
AD-59078.1	A-119939.1	UfsgsUfcUfuCfuUfAfAfuGfaUfuGfaAfcAfL96	230	A-119940.1	usGfsuUfcAfaUfcAfuaaAfgAfaGfaCfasasa	318
AD-59056.2	A-119962.1	CfsasCfcUfgGfaAfAfAfuGfaAfcUfcAfcCfL96	231	A-119963.1	gsGfsuGfaGfuUfcAfuuuUfcCfaGfgUfgscsu	319
AD-59056.1	A-119962.1	CfsasCfcUfgGfaAfAfAfuGfaAfcUfcAfcCfL96	232	A-119963.1	gsGfsuGfaGfuUfcAfuuuUfcCfaGfgUfgscsu	320
AD-59091.2	A-119958.1	UfsusUfuGfcUfcUfGfGfuGfaAfuUfaCfaUfL96	233	A-119959.1	asUfsgUfaAfuUfcAfccaGfaGfcAfaAfasasc	321
AD-59091.1	A-119958.1	UfsusUfuGfcUfcUfGfGfuGfaAfuUfaCfaUfL96	234	A-119959.1	asUfsgUfaAfuUfcAfccaGfaGfcAfaAfasasc	322
AD-59083.2	A-120018.1	AfscsCfcUfuUfgUfCfUfuCfuUfaAfuGfaUfL96	235	A-120019.1	asUfscAfuUfaAfgAfagaCfaAfaGfgGfususu	323
AD-59083.1	A-120018.1	AfscsCfcUfuUfgUfCfUfuCfuUfaAfuGfaUfL96	236	A-120019.1	asUfscAfuUfaAfgAfagaCfaAfaGfgGfususu	324
AD-59073.2	A-119952.1	UfsusGfaAfcAfaAfAfUfaCfcAfaGfuCfuCfL96	237	A-119953.1	gsAfsgAfcUfuGfgUfauuUfuGfuUfcAfasusc	325
AD-59073.1	A-119952.1	UfsusGfaAfcAfaAfAfUfaCfcAfaGfuCfuCfL96	238	A-119953.1	gsAfsgAfcUfuGfgUfauuUfuGfuUfcAfasusc	326
AD-59066.2	A-119935.1	GfsusUfcAfaCfaAfAfCfcCfuUfuGfuCfuUfL96	239	A-119936.1	asAfsgAfcAfaAfgGfguuUfgUfuGfaAfcusu	327
AD-59066.1	A-119935.1	GfsusUfcAfaCfaAfAfCfcCfuUfuGfuCfuUfL96	240	A-119936.1	asAfsgAfcAfaAfgGfguuUfgUfuGfaAfcusu	328

AD-59059.2	A-120010.1	AfsasAfuAfcCfaAfGfUfcUfcCfcCfuCfuUfL96	241	A-120011.1	asAfsGfGfGfGfaGfacuUfgGfuAfuUfusug	329
AD-59059.1	A-120010.1	AfsasAfuAfcCfaAfGfUfcUfcCfcCfuCfuUfL96	242	A-120011.1	asAfsGfGfGfGfaGfacuUfgGfuAfuUfusug	330
AD-59070.2	A-119998.1	UfsusUfuUfgCfuCfUfGfgUfgAfaUfuAfcAfL96	243	A-119999.1	usGfsuAfaUfuCfaCfcagAfgCfaAfaAfascsu	331
AD-59070.1	A-119998.1	UfsusUfuUfgCfuCfUfGfgUfgAfaUfuAfcAfL96	244	A-119999.1	usGfsuAfaUfuCfaCfcagAfgCfaAfaAfascsu	332
AD-59063.2	A-119980.1	AfsgsUfuCfaAfcAfAfAfcCfcUfuUfgUfcUfL96	245	A-119981.1	asGfsaCfaAfaGfgGfuuuGfuUfgAfaCfusug	333
AD-59063.1	A-119980.1	AfsgsUfuCfaAfcAfAfAfcCfcUfuUfgUfcUfL96	246	A-119981.1	asGfsaCfaAfaGfgGfuuuGfuUfgAfaCfusug	334
AD-59069.2	A-119982.1	AfsasUfgAfuUfgAfAfCfaAfaAfuAfcCfaAfL96	247	A-119983.1	usUfsgGfuAfuUfuUfguuCfaAfuCfaUfusasa	335
AD-59069.1	A-119982.1	AfsasUfgAfuUfgAfAfCfaAfaAfuAfcCfaAfL96	248	A-119983.1	usUfsgGfuAfuUfuUfguuCfaAfuCfaUfusasa	336
AD-59082.2	A-120002.1	UfsasCfuGfgAfaCfCfUfaUfgAfuCfuGfaAfL96	249	A-120003.1	usUfscAfgAfuCfaUfaggUfuCfcAfgUfasasu	337
AD-59082.1	A-120002.1	UfsasCfuGfgAfaCfCfUfaUfgAfuCfuGfaAfL96	250	A-120003.1	usUfscAfgAfuCfaUfaggUfuCfcAfgUfasasu	338
AD-59088.2	A-120004.1	AfscsAfuUfaAfaGfAfAfgGfgUfuGfaGfcUfL96	251	A-120005.1	asGfscUfcAfaCfcCfuucUfuUfaAfuGfuscasa	339
AD-59088.1	A-120004.1	AfscsAfuUfaAfaGfAfAfgGfgUfuGfaGfcUfL96	252	A-120005.1	asGfscUfcAfaCfcCfuucUfuUfaAfuGfuscasa	340
AD-59080.2	A-119970.1	AfsasAfaUfuGfuGfGfAfuUfuGfgUfcAfaGfL96	253	A-119971.1	csUfsuGfaCfcAfaAfuccAfcAfaUfuUfusesc	341

AD-59080.1	A-119970.1	AfsasAfaUfuGfuGfGfAfuUfuGfgUfcAfaGfL96	254	A-119971.1	csUfsuGfaCfcAfaAfuccAfcAfaUfuUfuscsc	342
AD-59058.2	A-119994.1	AfsusUfaCfuGfgAfAfCfcUfaUfgAfuCfuGfL96	255	A-119995.1	csAfsgAfuCfaUfaGfguuCfcAfgUfaAfusgsg	343
AD-59058.1	A-119994.1	AfsusUfaCfuGfgAfAfCfcUfaUfgAfuCfuGfL96	256	A-119995.1	csAfsgAfuCfaUfaGfguuCfcAfgUfaAfusgsg	344
AD-59090.2	A-119942.1	CfsasCfaGfuUfuUfuGfcUfcUfgGfuGfaAfL96	257	A-119943.1	usUfscAfcCfaGfaGfcaaAfaAfcUfgUfsgusc	345
AD-59090.1	A-119942.1	CfsasCfaGfuUfuUfuGfcUfcUfgGfuGfaAfL96	258	A-119943.1	usUfscAfcCfaGfaGfcaaAfaAfcUfgUfsgusc	346
AD-59057.2	A-119978.1	UfsusAfaAfgAfaGfGfGfuUfgAfgCfuGfgUfL96	259	A-119979.1	asCfscAfgCfuCfaAfcccUfuCfuUfuAfasusg	347
AD-59057.1	A-119978.1	UfsusAfaAfgAfaGfGfGfuUfgAfgCfuGfgUfL96	260	A-119979.1	asCfscAfgCfuCfaAfcccUfuCfuUfuAfasusg	348
AD-59051.2	A-119976.1	AfsgsUfgAfgCfaUfCfGfcUfaCfaGfcCfuUfL96	261	A-119977.1	asAfsgGfcUfgUfaGfcgaUfgCfuCfaCfusgsg	349
AD-59051.1	A-119976.1	AfsgsUfgAfgCfaUfCfGfcUfaCfaGfcCfuUfL96	262	A-119977.1	asAfsgGfcUfgUfaGfcgaUfgCfuCfaCfusgsg	350
AD-59065.2	A-120012.1	AfsasGfgAfgCfuUfGfAfcAfgAfgAfcAfcAfL96	263	A-120013.1	usGfsuGfuCfuCfuGfucaAfgCfuCfcUfusgsa	351
AD-59065.1	A-120012.1	AfsasGfgAfgCfuUfGfAfcAfgAfgAfcAfcAfL96	264	A-120013.1	usGfsuGfuCfuCfuGfucaAfgCfuCfcUfusgsa	352
AD-59087.2	A-119988.1	GfsusGfgAfuAfaGfUfUfuUfuGfgAfgGfaUfL96	265	A-119989.1	asUfscCfuCfcAfaAfaacUfuAfuCfcAfcusa	353
AD-59087.1	A-119988.1	GfsusGfgAfuAfaGfUfUfuUfuGfgAfgGfaUfL96	266	A-119989.1	asUfscCfuCfcAfaAfaacUfuAfuCfcAfcusa	354

AD-59075.2	A-119984.1	GfsasUfuGfaAfcAfAfAfaUfaCfcAfaGfuCfL96	267	A-119985.1	gsAfscUfuGfgUfaUfuuuGfuUfcAfaUfcsasu	355
AD-59075.1	A-119984.1	GfsasUfuGfaAfcAfAfAfaUfaCfcAfaGfuCfL96	268	A-119985.1	gsAfscUfuGfgUfaUfuuuGfuUfcAfaUfcsasu	356
AD-59092.2	A-119974.1	GfscsUfcUfcCfaAfGfGfcCfGufgCfaUfaAfL96	269	A-119975.1	usUfsaUfgCfaCfGfGccuUfgGfaGfaGfcsusu	357
AD-59092.1	A-119974.1	GfscsUfcUfcCfaAfGfGfcCfGufgCfaUfaAfL96	270	A-119975.1	usUfsaUfgCfaCfGfGccuUfgGfaGfaGfcsusu	358
AD-59081.2	A-119986.1	AfscsCfuGfgAfaAfAfUfgAfaCfuCfaCfcCfL96	271	A-119987.1	gsGfsgUfgAfgUfuCfaauUfuCfcAfgGfusgsc	359
AD-59081.1	A-119986.1	AfscsCfuGfgAfaAfAfUfgAfaCfuCfaCfcCfL96	272	A-119987.1	gsGfsgUfgAfgUfuCfaauUfuCfcAfgGfusgsc	360
AD-59064.2	A-119996.1	GfsgsGfaCfcAfaGfGfCfuGfaCfaCfuCfaCfL96	273	A-119997.1	gsUfsgAfgUfgUfcAfgccUfuGfgUfcCfcsca	361
AD-59064.1	A-119996.1	GfsgsGfaCfcAfaGfGfCfuGfaCfaCfuCfaCfL96	274	A-119997.1	gsUfsgAfgUfgUfcAfgccUfuGfgUfcCfcsca	362
AD-59052.2	A-119992.1	GfscsCfaUfgUfuUfUfUfaGfaGfgCfcAfuAfL96	275	A-119993.1	usAfsuGfgCfcUfcUfaaaAfaCfaUfgGfcscc	363
AD-59052.1	A-119992.1	GfscsCfaUfgUfuUfUfUfaGfaGfgCfcAfuAfL96	276	A-119993.1	usAfsuGfgCfcUfcUfaaaAfaCfaUfgGfcscc	364
AD-59076.2	A-120000.1	CfscsUfgGfaAfaAfUfGfaAfcUfcAfcCfcAfL96	277	A-120001.1	usGfsgGfuGfaGfuUfcuUfuUfcCfaGfcsusg	365
AD-59076.1	A-120000.1	CfscsUfgGfaAfaAfUfGfaAfcUfcAfcCfcAfL96	278	A-120001.1	usGfsgGfuGfaGfuUfcuUfuUfcCfaGfcsusg	366
AD-59068.2	A-119966.1	AfsasGfaGfgCfcAfAfGfaAfaCfaGfaUfcAfL96	279	A-119967.1	usGfsaUfcUfgUfuUfcuuGfgCfcUfcUfscsg	367

AD-59068.1	A-119966.1	AfsasGfaGfgCfcAfAfGfaAfaCfaGfaUfcAfL96	280	A-119967.1	usGfsaUfcUfgUfuUfcuuGfgCfcUfcUfuscsg	368
AD-59089.2	A-120020.1	GfsgsCfaAfaUfgGfGfAfgAfgAfcCfcUfuUfL96	281	A-120021.1	asAfsaGfgGfuCfuCfuccCfaUfuUfgCfcsusu	369
AD-59089.1	A-120020.1	GfsgsCfaAfaUfgGfGfAfgAfgAfcCfcUfuUfL96	282	A-120021.1	asAfsaGfgGfuCfuCfuccCfaUfuUfgCfcsusu	370
AD-59093.2	A-119990.1	UfsgsGfgAfaAfaGfUfGfgUfgAfaUfcCfcAfL96	283	A-119991.1	usGfsgGfaUfuCfaCfcacUfuUfuCfcCfasusg	371
AD-59093.1	A-119990.1	UfsgsGfgAfaAfaGfUfGfgUfgAfaUfcCfcAfL96	284	A-119991.1	usGfsgGfaUfuCfaCfcacUfuUfuCfcCfasusg	372
AD-59061.2	A-119948.1	GfsgsGfgAfcCfaAfGfGfcUfgAfcAfcUfcAfL96	285	A-119949.1	usGfsaGfuGfuCfaGfccuUfgGfuCfcCfcsasg	373
AD-59061.1	A-119948.1	GfsgsGfgAfcCfaAfGfGfcUfgAfcAfcUfcAfL96	286	A-119949.1	usGfsaGfuGfuCfaGfccuUfgGfuCfcCfcsasg	374
AD-59074.2	A-119968.1	GfsasCfaUfuAfaAfGfAfaGfgGfuUfgAfgCfL96	287	A-119969.1	gsCfsuCfaAfcCfcUfucuUfuAfaUfgUfcsasu	375
AD-59074.1	A-119968.1	GfsasCfaUfuAfaAfGfAfaGfgGfuUfgAfgCfL96	288	A-119969.1	gsCfsuCfaAfcCfcUfucuUfuAfaUfgUfcsasu	376
AD-59079.2	A-119954.1	GfsgsCfcAfuGfuUfUfUfuAfgAfgGfcCfaUfL96	289	A-119955.1	asUfsgGfcCfuCfuAfaaaAfcAfuGfgCfcscsc	377
AD-59079.1	A-119954.1	GfsgsCfcAfuGfuUfUfUfuAfgAfgGfcCfaUfL96	290	A-119955.1	asUfsgGfcCfuCfuAfaaaAfcAfuGfgCfcscsc	378
AD-59071.2	A-120014.1	UfsusCfcUfgCfcUfGfAfuGfaGfgGfgAfaAfL96	291	A-120015.1	usUfsuCfcCfcUfcAfucaGfgCfaGfgAfasgsa	379
AD-59071.1	A-120014.1	UfsusCfcUfgCfcUfGfAfuGfaGfgGfgAfaAfL96	292	A-120015.1	usUfsuCfcCfcUfcAfucaGfgCfaGfgAfasgsa	380

AD-59086.2	A-119972.1	CfsusCfuCfcAfaGfGfCfcGfuGfcAfuAfaGfL96	293	A-119973.1	csUfsuAfuGfcAfcGfgccUfuGfgAfgAfgscsu	381
AD-59086.1	A-119972.1	CfsusCfuCfcAfaGfGfCfcGfuGfcAfuAfaGfL96	294	A-119973.1	csUfsuAfuGfcAfcGfgccUfuGfgAfgAfgscsu	382
AD-59094.2	A-120006.1	AfsgsCfuCfuCfcAfAfGfgCfcGfuGfcAfuAfL96	295	A-120007.1	usAfsuGfcAfcGfgCfcuuGfgAfgAfgCfususc	383
AD-59094.1	A-120006.1	AfsgsCfuCfuCfcAfAfGfgCfcGfuGfcAfuAfL96	296	A-120007.1	usAfsuGfcAfcGfgCfcuuGfgAfgAfgCfususc	384
AD-59085.2	A-119956.1	UfscsCfuGfgAfgGfGfCfcUfgAfaUfuUfcAfL96	297	A-119957.1	usGfsaAfaUfuCfaGfgccCfuCfcAfgGfasusu	385
AD-59085.1	A-119956.1	UfscsCfuGfgAfgGfGfCfcUfgAfaUfuUfcAfL96	298	A-119957.1	usGfsaAfaUfuCfaGfgccCfuCfcAfgGfasusu	386
AD-59067.2	A-119950.1	UfsusGfgUfcAfaGfGfAfgCfuUfgAfcAfgAfL96	299	A-119951.1	usCfsuGfuCfaAfgCfuccUfuGfaCfcAfasasu	387
AD-59067.1	A-119950.1	UfsusGfgUfcAfaGfGfAfgCfuUfgAfcAfgAfL96	300	A-119951.1	usCfsuGfuCfaAfgCfuccUfuGfaCfcAfasasu	388
AD-59053.2	A-120008.1	UfsusUfgGfuCfaAfGfGfaGfcUfuGfaCfaGfL96	301	A-120009.1	csUfsgUfcAfaGfcUfccuUfgAfcCfaAfasusc	389
AD-59053.1	A-120008.1	UfsusUfgGfuCfaAfGfGfaGfcUfuGfaCfaGfL96	302	A-120009.1	csUfsgUfcAfaGfcUfccuUfgAfcCfaAfasusc	390
AD-59077.2	A-120016.1	UfscsCfcCfaGfuGfAfGfcAfuCfGfuAfcAfL96	303	A-120017.1	usGfsuAfgCfgAfuGfcucAfcUfgGfgGfasgsa	391
AD-59077.1	A-120016.1	UfscsCfcCfaGfuGfAfGfcAfuCfGfuAfcAfL96	304	A-120017.1	usGfsuAfgCfgAfuGfcucAfcUfgGfgGfasgsa	392

Пример 2. Скрининг *in vitro* и *in vivo*

Подмножество этих дуплексов оценивали в отношении эффективности в анализах с использованием разовой дозы, как описано выше. В таблице 3 показаны результаты скрининга с использованием разовой дозы в отношении первичных гепатоцитов мыши (Нер3b), трансфицированных указанными модифицированными iRNA, конъюгированными с GalNAC, и результаты скрининга со свободным поглощением разовой дозы первичными гепатоцитами макака-крабоведа (PCH) с использованием указанных модифицированных iRNA, конъюгированных с GalNAC. Данные выражены в виде доли оставшегося количества матричной РНК по сравнению с таким количеством в клетках, обработанных AD-1955, контролем без целенаправленного воздействия для экспериментов с использованием Нер3В, или по сравнению с интактными клетками для экспериментов с использованием PCH.

Таблица 3

Скрининг в отношении эффективности Serpinal при свободном поглощении первичными клетками Нер3b и первичными гепатоцитами (PCH) макака-крабоведа

	Трансфекция (Нер3b)				Свободное поглощение (PCH)			
	10 нМ		0,1 нМ		10 нМ		500 нМ	
	Средн.	SD	Средн.	SD	Средн.	SD	Средн.	SD
AD-58681	2,7	0,8	4,2	0,5	72,7	9,8	42,1	4,6
AD-59084	2,1	0,2	6,2	0,6	74,5	10,1	54,2	13,3
AD-59060	1,2	0,4	6,5	0,3	87,4	8,7	69,5	4,5
AD-59054	2,2	1,4	7,2	0,7	59,1	10,8	50,3	5,0
AD-59072	1,3	0,3	7,7	0,2	87,6	6,4	86,2	9,9
AD-59048	1,1	0,4	8,1	0,4	72,9	19,5	46,4	5,8

AD- 59062	1,4	0,0	9,2	0,6	77,9	11,6	64,9	11,0
AD- 59078	1,8	0,0	12,1	0,2	89,2	9,3	71,1	3,2
AD- 59056	1,8	0,1	20,2	1,8	88,9	13,4	83,7	8,5
AD- 59091	3,8	0,5	26,6	4,1	89,7	15,0	75,6	7,5
AD- 59083	2,3	0,6	27,2	2,5	94,5	9,1	74,5	11,9
AD- 59073	3,7	0,7	27,3	2,3	101,5	15,7	85,1	18,9
AD- 59066	5,9	1,7	31,5	3,4	106,2	25,3	28,2	27,1
AD- 59059	2,9	0,7	32,9	3,4	101,3	10,4	84,9	18,0
AD- 59070	7,4	1,0	33,9	6,6	87,5	9,3	80,1	13,2
AD- 59063	3,0	0,3	35,0	3,9	99,3	4,9	91,1	7,9
AD- 59069	5,6	0,5	39,6	3,5	90,5	19,6	100,4	7,3
AD- 59082	5,0	2,3	41,3	1,8	89,2	27,3	87,8	3,9
AD- 59088	5,2	0,2	41,5	2,1	96,4	17,1	96,2	18,2
AD- 59080	8,2	1,8	41,8	2,1	94,3	4,9	93,4	15,0
AD- 59058	6,4	0,7	43,9	0,3	112,1	12,7	92,5	8,6
AD- 59090	5,8	0,5	44,8	0,8	119,3	14,6	100,2	26,7
AD- 59057	6,2	0,3	47,5	0,9	95,2	7,8	76,1	5,8

AD- 59051	7,0	0,3	52,2	4,4	89,4	2,8	82,0	13,6
AD- 59065	12,7	1,4	60,1	4,4	94,1	9,7	90,6	5,9
AD- 59087	7,7	1,0	62,1	4,7	92,3	6,8	72,6	10,4
AD- 59075	9,3	2,3	62,9	2,0	101,7	10,6	99,0	18,8
AD- 59092	14,6	4,0	65,5	1,7	87,4	17,3	94,1	21,2
AD- 59081	10,9	2,3	68,2	2,4	115,1	18,4	106,1	11,8
AD- 59064	11,0	0,1	71,6	4,5	91,3	14,7	87,2	10,3
AD- 59052	21,8	2,6	78,6	2,4	99,9	9,2	88,9	17,5
AD- 59076	14,5	4,2	79,4	1,5	84,9	27,2	101,7	10,8
AD- 59068	48,1	1,6	81,8	2,5	100,2	19,7	107,1	25,8
AD- 59089	30,4	0,6	82,6	9,0	87,3	11,9	89,1	3,7
AD- 59093	23,5	0,2	85,2	5,4	72,1	48,5	103,0	13,2
AD- 59061	38,1	2,2	86,5	4,4	100,3	13,3	102,3	9,0
AD- 59074	38,9	5,4	86,6	3,0	106,5	10,3	100,6	14,7
AD- 59079	45,1	0,8	87,6	4,8	100,5	17,4	92,1	33,3
AD- 59071	58,6	1,0	96,2	7,1	82,3	25,8	110,7	2,2
AD- 59086	78,3	1,1	96,3	4,1	93,1	7,3	97,1	17,0

AD-59094	96,6	2,7	102,1	0,8	75,2	52,7	76,9	7,9
AD-59085	99,3	3,7	102,5	4,4	94,1	10,0	102,4	16,3
AD-59067	88,7	0,8	103,7	0,9	118,5	17,2	108,9	30,3
AD-59053	98,5	4,7	103,7	1,9	98,7	14,8	96,4	8,1
AD-59077	100,5	8,2	104,8	1,6	88,0	32,5	88,1	4,1

Значения IC₅₀ для выбранных дуплексов при трансфекции первичных Нер3Вare показаны в таблице 4.

Таблица 4

Значения IC₅₀ Serpinal для выбранных дуплексов при трансфекции клеточной линии Нер3В человека

Дуплекс	IC ₅₀ (нМ)
AD-58681	0,031
AD-59054	0,128
AD-59062	0,130
AD-59084	0,143
AD-59048	0,146
AD-59072	0,197
AD-59056	0,408
AD-59078	0,600
AD-59066	0,819
AD-59060	1,883

Подмножество этих дуплексов оценивали в отношении *in vivo* эффективности у трансгенных мышей, экспрессирующих форму Z-ААТ человеческого Serpinal (см., например, Dycaico, et al. (1988) *Science* 242:1409-12; Carlson, et al. (1989) *J Clin Invest* 83:1183-90; Perfumo, et al.

(1994) *Ann Hum Genet.* 58:305-20. Это общепризнанная модель болезни печени, ассоциированной с недостаточностью ААТ. Вкратце, в день 0 трансгенным мышам подкожно вводили разовую

дозу 20 мг/кг iRNA, перечисленных в таблице 5. Сыворотку собирали в дни -10, -5, 0, 3, 5, 7, 10 и 17, и при этом количество циркулирующего белка Serpinal определяли при помощи анализа ELISA, специфичного в отношении белков человека. Результаты этих анализов представлены на фигуре 1. Как показано на фигуре 1, AD-58681-6PS был наиболее эффективным в отношении уменьшения сывороточных уровней белка Serpinal у этих мышей.

Таблица 5

AD-54330.2	A-111587.3	смысловая	GfuCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 393)
	A-111588.3	антисмысловая	aAfgAfuAfuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 394)
AD-58681.1	A-119065.1	смысловая	GfsusCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 395)
	A-119066.1	антисмысловая	asAfsgAfuAfuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 396)
AD-58682.1	A-119065.1	смысловая	GfsusCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 397)
	A-119067.1	антисмысловая	asAfsgAfsuAfsuUfgGfugcUfgUfsuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 398)
AD-58683.1	A-119068.1	смысловая	GsusccAAcAGcAccAAuAucuuL96 (SEQ ID NO: 399)
	A-119067.1	антисмысловая	asAfsgAfsuAfsuUfgGfugcUfgUfsuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 400)

Пример 3. Эффективность si-AAT у трансгенных мышей

Пять дуплексов siRNA, описанных в предыдущих примерах, с низкими значениями IC50 тестировали *in vivo* в отношении эффективности. Дуплексы siRNA вводили при 10 мг/кг трансгенным мышам, экспрессирующим аллель Z-AAT человека, в общепризнанной модели болезни печени, ассоциированной с недостаточностью ААТ. Мышам вводили дозу в день 0, и при этом сывороточный уровень ААТ человека наблюдали в течение 21 дня после введения дозы (фигура 2А). Каждая точка представляет среднее для трех мышей, а планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Мышей умерщвляли в день 21 и обрабатывали их печень для измерения уровней mRNA. На графике показаны данные для mRNA hAAT, нормализованные в соответствии с данными для GAPDH для каждой

группы (фигура 2B). Столбики отражают среднее, а планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Как показано на фигурах 2A и 2B, AD59054 был наиболее эффективным в отношении уменьшения уровней mRNA hAAT у мышей.

Пример 4. Длительная дозозависимая супрессия ААТ

Эффективность дуплекса siRNA AD-59054 в трансгенной животной модели болезни печени, ассоциированной с недостаточностью ААТ, измеряли посредством подкожного введения различных доз дуплекса siRNA AD-59054. Сыворотку отбирали через различные промежутки времени для измерения сывороточных уровней белка hAAT с использованием ELISA, специфичного в отношении человеческого ААТ. Кривая эффективности, демонстрирующая максимальное снижение, которое достигается при различных дозах, протестированных на мышах, представлена на фигуре 3A. Каждая точка представляет среднее для трех животных, а планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Продолжительность снижения после разовой дозы siRNA ААТ при 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг показана на фигуре 3B. Каждая точка представляет среднее для трех животных, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Уровни hAAT нормализовали к среднему для трех заборов крови для каждого животного. Вводили siRNA в PBS, следовательно, обработанная PBS группа служит контролем для того, чтобы учесть вариабельность уровней сывороточного hAAT. Подкожное введение siRNA ААТ приводило к зависимому от дозы ингибированию сывороточного hAAT, причем максимальное ингибирование >95% наблюдали при дозе 3 мг/кг. Разовая доза 1 мг/кг обеспечивала поддержание 40% уровней hAAT в течение по меньшей мере 15 дней. Животным также вводили AD-59054 при дозе 0,5 мг/кг дважды в неделю (фигура 3C). Повторное введение дозы приводило к кумулятивному ответу и более чем 90% супрессии белка. Каждая точка представляет среднее для четырех животных, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение.

Пример 5. Уменьшение частоты опухолей при снижении уровня Z-ААТ

У трансгенных мышей, экспрессирующих Z-ААТ человека, с

возрастом развиваются опухоли. Этот эксперимент разработали для определения того, может ли длительное введение этим старым мышам доз siRNA в соответствии с настоящим изобретением привести к уменьшению частоты опухолей у мышей. В частности, старым мышам (в возрасте 25-46 недель) с фиброзом печени длительно вводили дозы дуплекса siRNA AD-58681 для уменьшения частоты опухолей печени. Один раз в две недели (Q2W) животным подкожно вводили дозы PBS или 10 мг/кг siRNA AAT в количестве 11 доз, и при этом их умерщвляли через 7 дней после последней дозы (фигура 4A). Измеряли уровни mRNA hAAT, mRNA Col1a2 и mRNA PtPrc в печени в контрольной группе и группах с обработкой. У животных, обработанных siRNA AAT, наблюдали более чем 90% уменьшение уровней mRNA hAAT (фигура 4B). Измеряли уровень mRNA Col1a2 в качестве маркера фиброза, и при этом уровень этого маркера уменьшался у животных, обработанных siRNA AAT (фигура 4C). Измеряли уровень mRNA PtPrc (CD45) в качестве маркера присутствия клеток иммунной системы (фигура 4D). В печени, пораженной болезнью, наблюдалось увеличение инфильтрации клеток иммунной системы, и при этом, как показано на фигуре 4D, наблюдалось значительное уменьшение уровней mRNA PtPrc в случае обработки животных siRNA AAT.

Образцы сыворотки собирали после введения первой дозы для того, чтобы наблюдать степень супрессии ААТ. У всех животных, обработанных siRNA ААТ, наблюдали менее 5% остаточного белка ААТ, и при этом введение разовой дозы обеспечивало поддержание уровней ААТ ниже 80% в течение 14 дней до введения следующей дозы (фигура 5A). Таблица 6 относится к данным наблюдений, полученным для животных на момент умерщвления (день 132). У трансгенных животных, которым вводили дуплекс siRNA, наблюдалось уменьшение частоты опухолей по сравнению с необработанными контрольными животными. В частности, у четырех из шести животных, которых обрабатывали PBS, наблюдали опухоли в печени, тогда как только у одного из шести животных, которых обрабатывали siRNA ААТ, наблюдали опухоль печени. При помощи t-критерия рассчитывали р-значение для различия по частоте опухолей, которое составляло 0,045. На фигуре 5B и фигуре 5C

показано PAS окрашивание срезов печени от двух однопометников, обработанных либо PBS, либо siRNA AAT. Окрашенные в более темный цвет точки представляют шарики или агрегаты Z-AAT. Эти данные указывают на то, что дуплекс siRNA является эффективным в отношении уменьшения уровней Z-AAT у трансгенных мышей, и при этом уменьшенные уровни Z-AAT характеризуются физиологической пользой, заключающейся в более здоровой печени.

Таблица 6

Обработка	№ животного	Наблюдение
PBS	4734	печень бледного цвета
	4737	большая опухоль в латеральной части левой доли, диаметром ~5 мм
	4754	печень бледного цвета, опухоль размером 2 мм в хвостатой доле, много очагов во 2-ой добавочной доле
	4759	печень темного цвета, опухоль размером 1,5 мм в хвостатой доле, очаг размером 1 мм в правой медиальной доле, несколько очагов размером 1 мм в 1-ой добавочной доле
	4771	опухоль размером 3 мм в левой латеральной доле
	4775	печень темного цвета
AAT-siRNA	4748	печень темного цвета
	4756	печень бледного цвета, опухоль размером 3 мм в хвостатой доле
	4760	печень темного цвета
	4770	без патологии
	4772	без патологии
	4776	без патологии

Пример 6. Оптимизация прототипа AD-59054

Как описано выше, было продемонстрировано, что AD-59054 обеспечивает длительную дозозависимую супрессию AAT *in vivo*.

Однако, нуклеотидная последовательность AD-59054 охватывает область mRNA AAT, которая содержит распространенный однонуклеотидный полиморфизм (SNP) (№ доступа в Reference SNP: rs1303 (см., например, www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)). В частности, локализация SNP соответствует нуклеотиду в положении 6 (5'-3') в антисмысловой нити AD-59054 (т.е. в пределах затравочной области AD-59054). Следовательно, поскольку ошибочные спаривания в пределах затравочной области могут приводить к нецелевым эффектам и/или потере эффективности, были получены дополнительные дуплексы с различными основаниями в положении 6 (5'-3') антисмысловой нити, исходя из последовательности AD-59054. Целевая mRNA содержит А, соответствующий положению 6 (5'-3') антисмысловой нити AD-59054. Последовательности этих дуплексов представлены в таблице 7. В таблице 8 представлены последовательности этих же дуплексов с различными химическими модификациями и конъюгированных с трехвалентным GalNAc.

Эти модифицированные дуплексы оценивали в отношении эффективности при помощи скрининга со свободным поглощением разовой дозы первичными гепатоцитами мыши (Нер3В), как описано выше. mRNA клетки Нер3В содержит С в положении, соответствующем положению 6 (5'-3') антисмысловой нити AD-59054. Значения IC₅₀ для дуплексов показаны в таблице 8. Как продемонстрировано в данном документе, одно ошибочное спаривание в пределах затравочной области в положении 6 было допустимо в случае всех оснований, за исключением С.

Подмножество этих дуплексов также оценивали в отношении эффективности *in vivo*. Трансгенным мышам, экспрессирующим аллель Z-AAT человека (и имеющим А в mRNA, который соответствует положению 6 (5'-3') в антисмысловой нити AD-59054) вводили 1,0 мг/кг AD-59054, AD-61719, AD-61700, AD-61726 или AD-61704 в день 0, и при этом сывороточный уровень ААТ человека, который измеряли, как описано выше, наблюдали в течение 14 дней после введения дозы (фигура 6). Каждая точка представляет среднее для трех мышей, а планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Как продемонстрировано на

фигуре 6, AD-61719 и AD-61704 показали столь же хороший результат, что и исходный AD-59054.

Таблица 7

Название дуплекса	Смысловая (5'→3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая (5'→3')	SEQ ID NO:
AD-59054	CUUCUUAUUGAUUGAACAAAA	401	UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC	409
AD-61704	CUUCUUAUUGAUUGACCAAAA	402	UUUUGGUCAAUCAUUAAGAAGAC	410
AD-61708	CUUCUUAUUGAUUGAUCAAAA	403	UUUUGAUCAAUCAUUAAGAAGAC	411
AD-61712	CUUCUUAUUGAUUGAGCAAAA	404	UUUUGCUCAAUCAUUAAGAAGAC	412
AD-61719	CUUCUUAUUGAUUGACCAAAA	405	UUUUGIUCAAUCAUUAAGAAGAC	413
AD-61700	CUUCUUAUUGAUUGACCAAAA	406	UUUUGNUCAAUCAUUAAGAAGAC	414
AD-61726	CUUCUUAUUGAUUGAACAAAA	407	UUUUGNUCAAUCAUUAAGAAGAC	415
AD-61716	CUUCUUAUUGAUUGAACAAAA	408	UUUUGNUCAAUCAUUAAGAAGAC	416

Пример 7. Оптимизация прототипа AD-59054

Дополнительные дуплексы получали, исходя из последовательности AD-59054, в том числе AD-61444. Модифицированная и немодифицированная смысловая и антисмысловая последовательности AD-61444 представлены в таблице 9.

Таблица 9

Название дуплекса	Немодифицированная смысловая (5'→3')	Немодифицированная антисмысловая (5'→3')
AD-61444	CUUCUUAUUGAUUGAACAAAA (SEQ ID NO: 417)	UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC (SEQ ID NO: 419)
	Модифицированная смысловая (5'→3')	Модифицированная антисмысловая (5'→3')
	csusucuaauGfAfuugaacaaaa L96 (SEQ ID NO: 418)	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAf aGfaAfgsasc (SEQ ID NO: 420)

Таблица 8

Название дуплекса	Основание в положении 6	Смысловая (5'→3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая (5'→3')	SEQ ID NO:	IC ₅₀
						Среднее значение
AD-59054	U (исходное соединение)	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfaCfaA faAfL96	421	usUfsuUfgUfuCfaAf ucaUfuAfaGfaAfgsa sc	429	0,098
AD-61704	G	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfcCfaA faAfL96	422	usUfsuUfgGfuCfaAf ucaUfuAfaGfaAfgsa sc	430	0,102
AD-61708	A	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfuCfaA faAfL96	423	usUfsuUfgAfuCfaAf ucaUfuAfaGfaAfgsa sc	431	0,147
AD-61712	C	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfgCfaA faAfL96	424	usUfsuUfgCfuCfaAf ucaUfuAfaGfaAfgsa sc	432	1,499
AD-61719	I (инозин)	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfcCfaA faAfL96	425	usUfsuUfgiuCfaAfuc aUfuAfaGfaAfgsasc	433	0,088
AD-61700	dI (дезоксининозин) (S/AS ¹ : C/dI)	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfcCfaA faAfL96	426	usUfsuUfgdluCfaAf ucaUfuAfaGfaAfgsa sc	434	0,097
AD-61726	dI (дезоксининозин) (S/AS: A/dI)	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfaCfaA faAfL96	427	usUfsuUfgdluCfaAf ucaUfuAfaGfaAfgsa sc	435	0,059
AD-61716	лишенный азотистого основания 2'-ОМе	CfsusUfcUfuAfaUf GfAfuUfgAfaCfaA faAfL96	428	usUfsuUfgY34uCfa AfucaUfuAfaGfaAfg sasc	436	0,333

¹ S/AS: Смысловая/антисмысловая

Пример 8. Введение дозы AD-59054, AD-61719 и AD-61444 приматам, отличным от человека

AD-59054, AD-61719 и AD-61444 тестировали в отношении эффективности у приматов, отличных от человека, посредством введения приматам разовой дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг AD-59054, AD-61719 или AD-61444. Образцы сыворотки собирали за пять дней до введения, в день 0 и в дни 3, 7, 10, 15, 20 и 30 после введения для наблюдения степени супрессии ААТ путем измерения

сывороточных уровней белка hAAT с использованием ELISA, специфичного в отношении AAT человека. Не наблюдали изменений уровней цитокинов или хемокинов в сыворотке животных, которым вводили любое из соединений, и при этом с введением этих соединений не были связаны никакие реакции в месте инъекции или проблемы со здоровьем, обусловленные введением лекарственного средства. На фигуре 7 показано, что разовая доза 1 мг/кг AD-59054, AD-61719 или AD-61444 (7A) или разовая доза 3 мг/кг AD-59054, AD-61719 или AD-61444 (7B) приводит в результате к зависимому от дозы и длительному снижению уровня белка AAT.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечный РНКи агент для ингибирования экспрессии Serpinal в клетке,

где указанный двухцепочечный РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где

смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности

5'-CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3' (SEQ ID NO:417)

и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающийся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности

5'-UUUUGUUC AUAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID NO:419),

где по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи и по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и

где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом.

2. Двухцепочечный РНКи агент по п.1, где один из 3-х нуклеотидных отличий в нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи представляет собой ошибочно спаренный нуклеотид в затравочной области антисмысловой цепи.

3. Двухцепочечный РНКи агент по п.2, где антисмысловая цепь содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

4. Двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.1-3, где все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

5. Двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.1-4, где по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из

3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида,

2'-O-метил модифицированного нуклеотида,

2'-фтор модифицированного нуклеотида,

2'-дезокси модифицированного нуклеотида,

заблокированного нуклеотида,
неосновного нуклеотида,
2'-амино модифицированного нуклеотида
2'-алкил модифицированного нуклеотида,
морфолинонуклеотида,
фосфорамидата,
нуклеотида, содержащего неприродное основание,
нуклеотида, содержащего 5'-фосфоротиоатную группу, и
концевого нуклеотида, связанного с производным холестерина или
бисдециламидной группой додекановой кислоты.

6. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-5, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.

7. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-5, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

8. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-7, где длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов.

9. Двухцепочечный РНК-агент по п.8, где длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов.

10. Двухцепочечный РНК-агент по п. 8, где длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов.

11. Двухцепочечный РНК-агент по п.8, где длина двухцепочечной области составляет 23-27 пары нуклеотидов.

12. Двухцепочечный РНК-агент по п.8, где длина двухцепочечной области составляет 19-21 пар нуклеотидов.

13. Двухцепочечный РНК-агент по п.8, где длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары нуклеотидов.

14. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-13, где длина каждой цепи независимо составляет 15-30 нуклеотидов.

15. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-13, где длина каждой цепи независимо составляет 19-30 нуклеотидов.

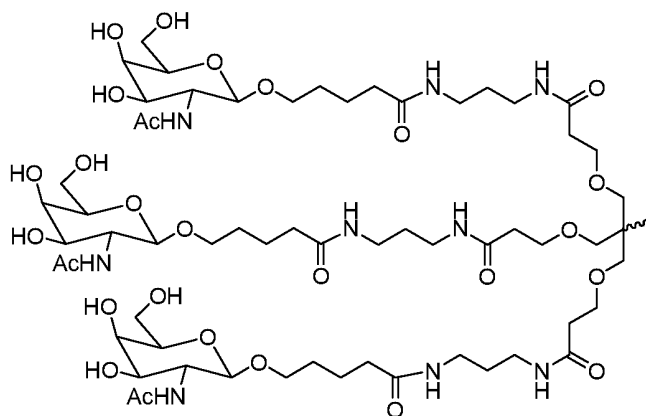
16. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-15, где по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из

LNA модифицированного нуклеотида,
 HNA модифицированного нуклеотида,
 CeNA модифицированного нуклеотида,
 2'-метоксиэтил модифицированного нуклеотида,
 2'-О-алкил модифицированного нуклеотида,
 2'-О-аллил модифицированного нуклеотида,
 2-С-аллил модифицированного нуклеотида,
 2'-фтор модифицированного нуклеотида,
 2'-дезоксид модифицированного нуклеотида,
 2'-гидроксил модифицированного нуклеотида и
 их комбинаций.

17. Двухцепочечный РНК-агент по п.16, где по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов представляет собой 2'-О-метил модифицированный нуклеотид или 2'-фтор модифицированный нуклеотид.

18. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-17, где лиганд представляет собой одно или несколько GalNAc-производных, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

19. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-18, где лиганд представляет собой



20. Двухцепочечный РНК-агент по любому из пп.1-19, где лиганд присоединен к 3' концу смысловой цепи.

21. Двухцепочечный РНК-агент по п.20, где РНК-агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме

1

не тупофосфонатную – мелкую крестообразную – свасты.

представляет собой антисмысловую цепь.

представляет собой смысловую цель

Цели

представляет собой антисмысловую цель.

представляет собой смысловую цепь.

5'-конце и на 3'-конце. Цепи

представляет собой антисмысловую цель.

31. Двухцепочечный РНКи агент по п.22, где указанный РНКи агент

содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

32. Двухцепочечный РНКи агент по п.31, где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце и

смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце или на 3'-конце.

33. Двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.1-32, где пара оснований в положении 1 на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

34. Двухцепочечный РНКи агент по п.1, где длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид, и длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида.

35. Двухцепочечный РНКи агент для ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке, где указанный двухцепочечный РНКи агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности

5'-CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3' (SEQ ID NO:417)

и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности

5'-UUUUGUUC AAUCAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID NO:419),

где по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификации,

где указанная антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце,

где по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи содержат модификацию,

где указанная смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные

межнуклеотидные связи на 5'-конце, и

где указанная смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими GalNA-производными, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

36. Двухцепочечный РНКи агент по п.35, где один из 3-х нуклеотидных отличий в нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи представляет собой ошибочно спаренный нуклеотид в затравочной области антисмысловой цепи.

37. Двухцепочечный РНКи агент по п.36, где антисмысловая цепь содержит универсальное основание в ошибочно спаренном нуклеотиде.

38. Двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.35-37, где все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

39. Двухцепочечный РНКи агент по п.1 или п.36, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5'-UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID NO:419).

40. Двухцепочечный РНКи агент по п.1 или п.36, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5'-CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3' (SEQ ID NO:417) и

антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5'-UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID NO:419).

41. Клетка, содержащая двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.1-40.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечный РНКи агент по любому из пп.1-40.

43. Фармацевтическая композиция по п.42, где указанный РНКи агент присутствует в небуферный растворе.

44. Фармацевтическая композиция по п.43, где указанный небуферный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

45. Фармацевтическая композиция по п.42, где указанный РНКи агент присутствует в буферном растворе.

46. Фармацевтическая композиция по п.45, где указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или

любую их комбинацию.

47. Фармацевтическая композиция по п.46, где указанный буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

48. Способ ингибирования экспрессии *Serpinal* в клетке *in vitro*, где способ включает:

(a) приведение в контакт клетки с двухцепочечным РНКи агентом по любому из пп.1-40 или с фармацевтической композицией по любому из пп.42-47; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточном для деградации транскрипта мРНК гена *Serpinal*, тем самым подавляя экспрессию гена *Serpinal* в клетке.

49. Способ по п.48, в котором экспрессия *Serpinal* ингибируется по меньшей мере на около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 98% или около 100%.

50. Применение терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи агента по любому из пп.1-40 или фармацевтической композиции по любому из пп.42-47 для лечения индивида, страдающего заболеванием, связанным с *Serpinal*.

51. Применение по п.50, где заболевание, связанное с *Serpinal*, представляет собой заболевание печени.

52. Применение по п.51, где заболевание печени выбрано из группы, состоящей из хронического заболевания печени, воспаления печени, цирроза, фиброза печени и/или гепатоцеллюлярной карциномы.

53. Применение терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи агента по любому из пп.1-40 или фармацевтической композиции по любому из пп.42-47 для ингибирования развития гепатоцеллюлярной карциномы у пациента с дефицитом *Serpinal*.

54. Применение терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи агента по любому из пп.1-40 или фармацевтической композиции по любому из пп.42-47 для уменьшения накопления неправильно свернутого *Serpinal* в печени у пациента с дефицитом *Serpinal*.

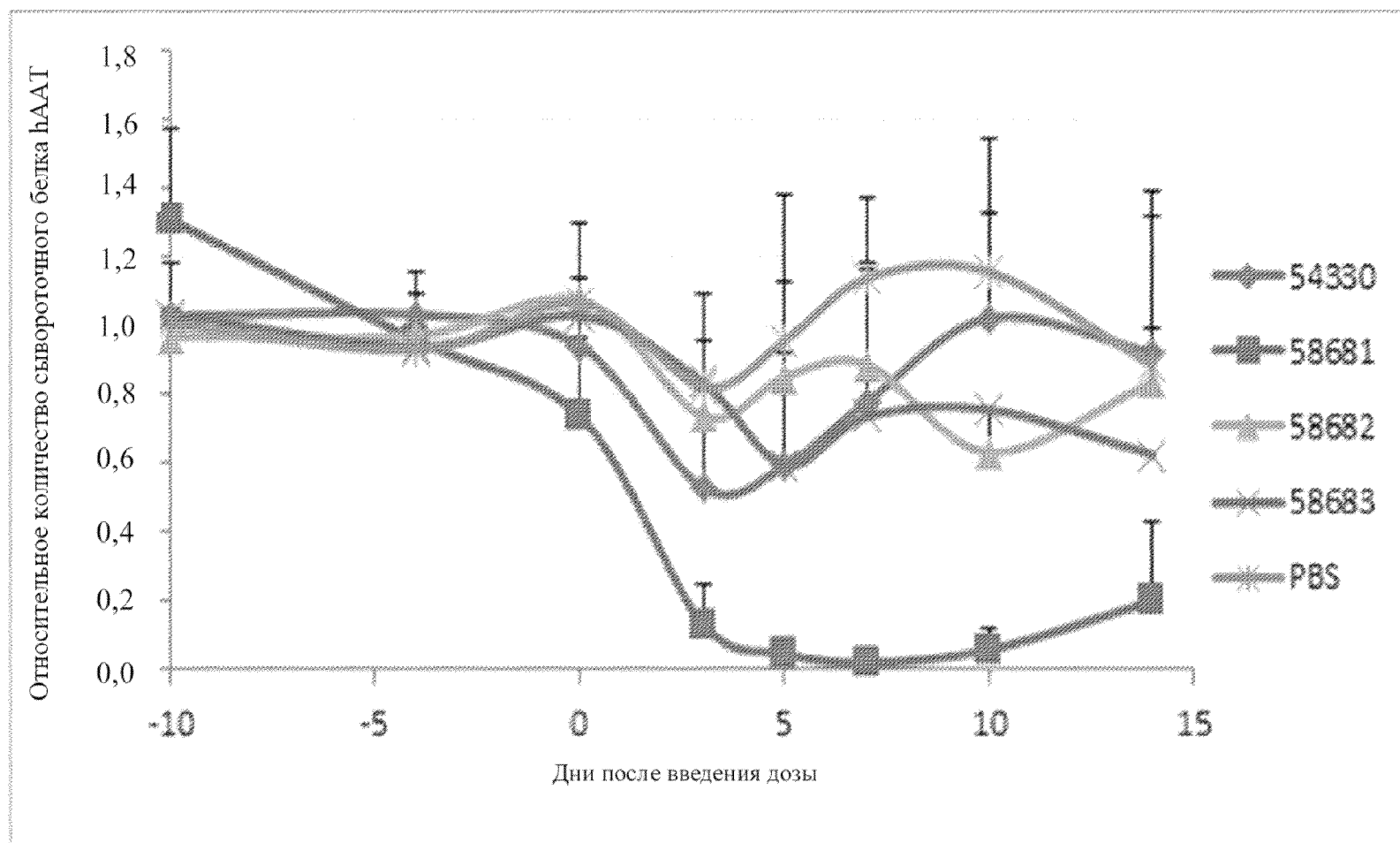
55. Применение по любому из пп.50-54, где пациентом является

человек.

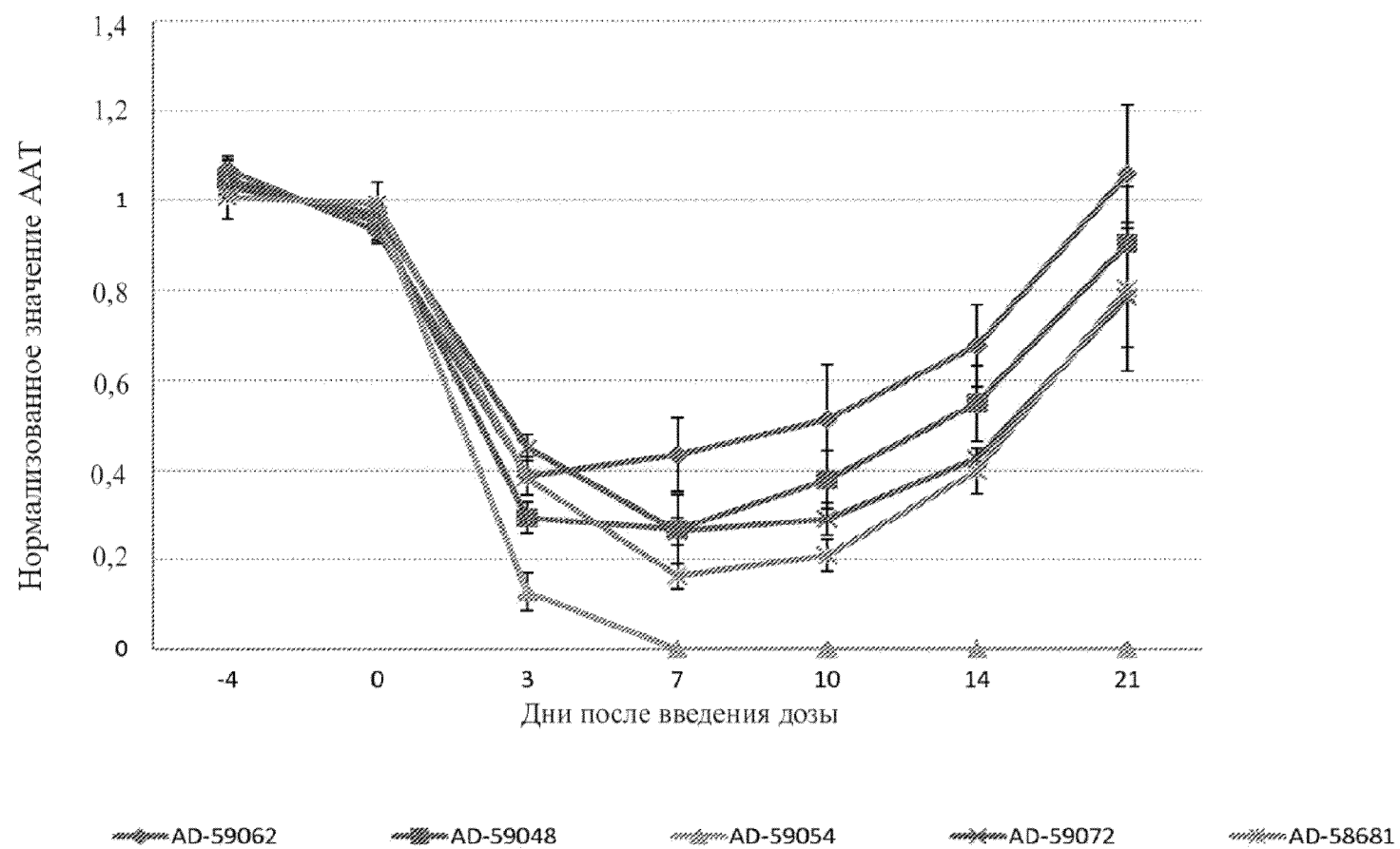
56. Применение по любому из пп.50-55, где двухцепочечный РНКи агент предназначен для подкожного введения.

57. Применение по любому из пп.50-55, где двухцепочечный РНКи агент предназначен для внутривенного введения.

По доверенности

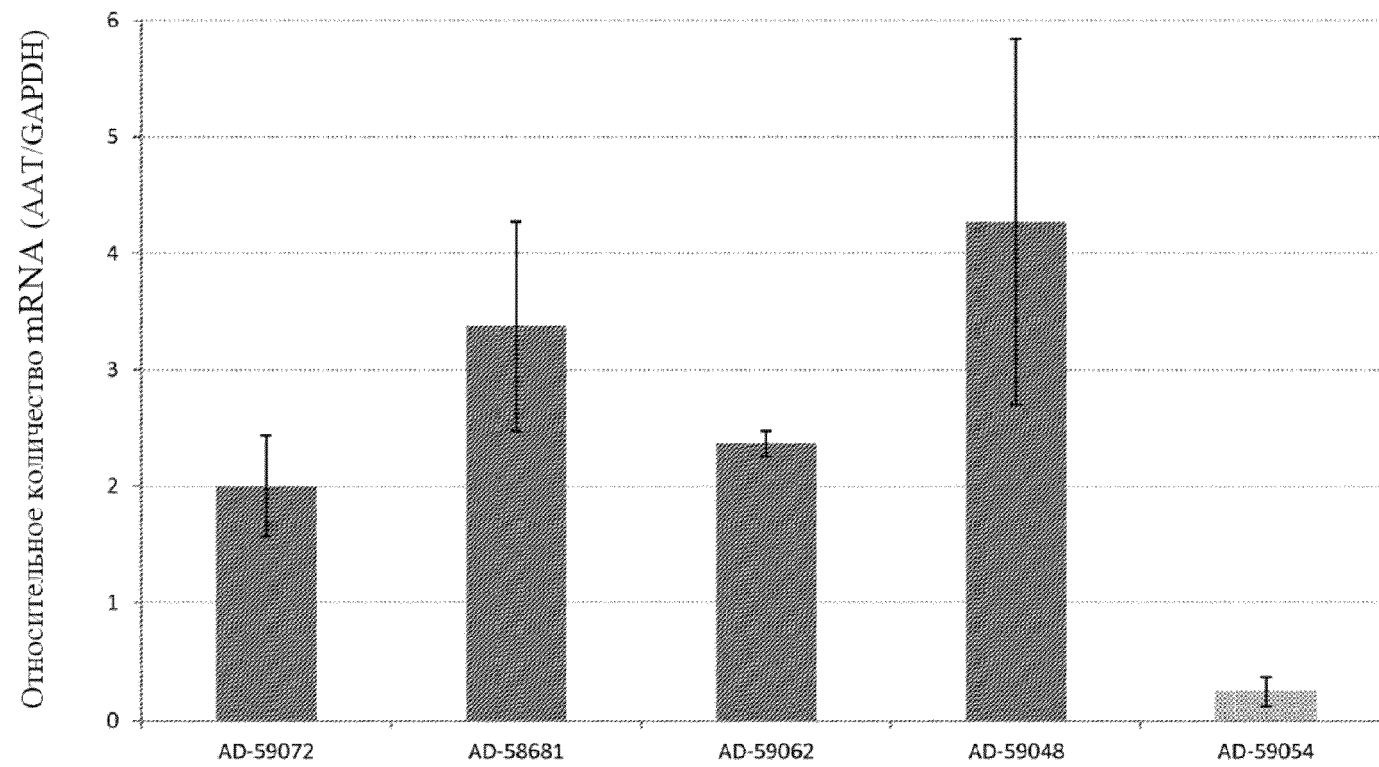


Фигура 1



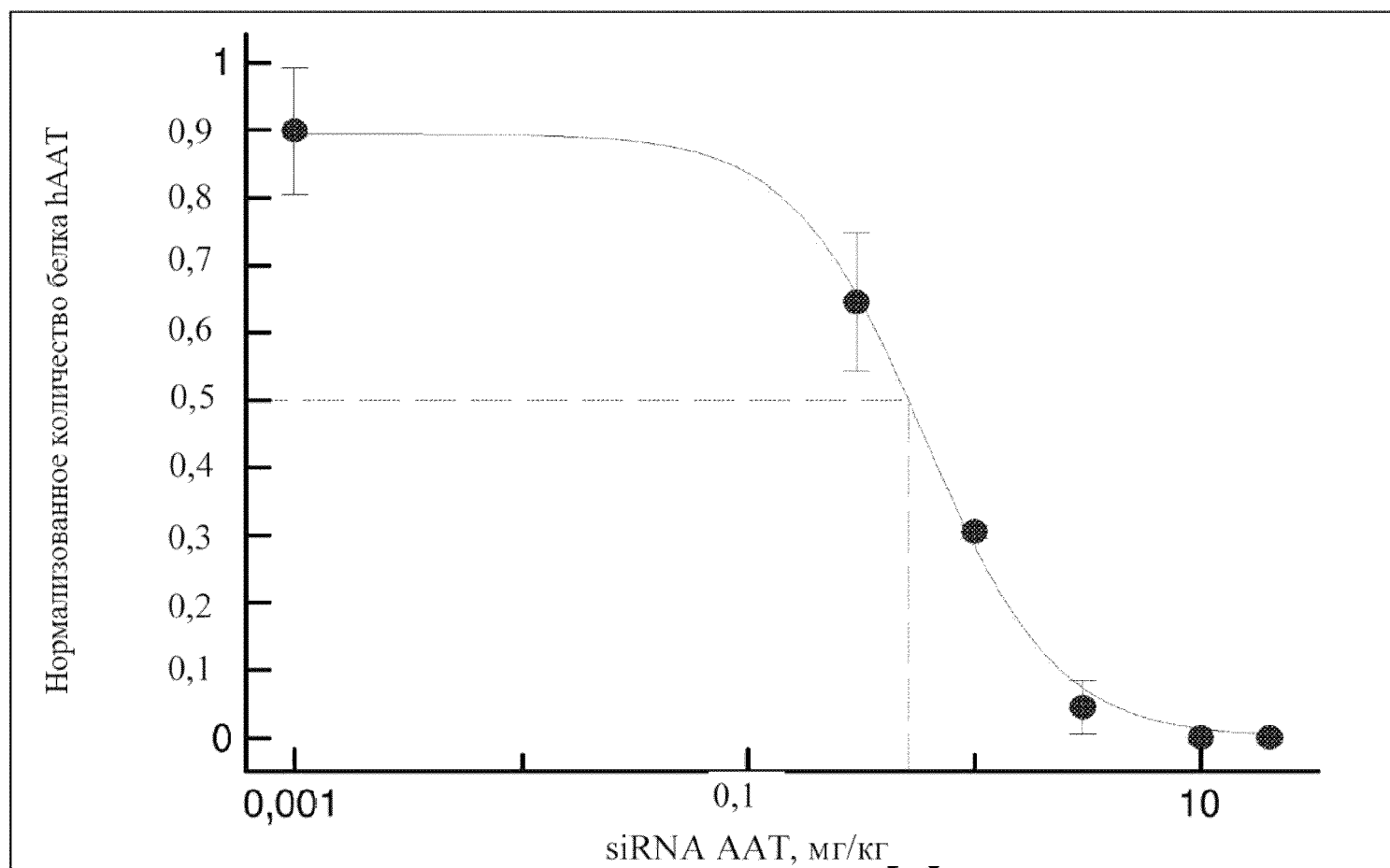
Фигура 2А

mRNA AAT в печени на 21 день

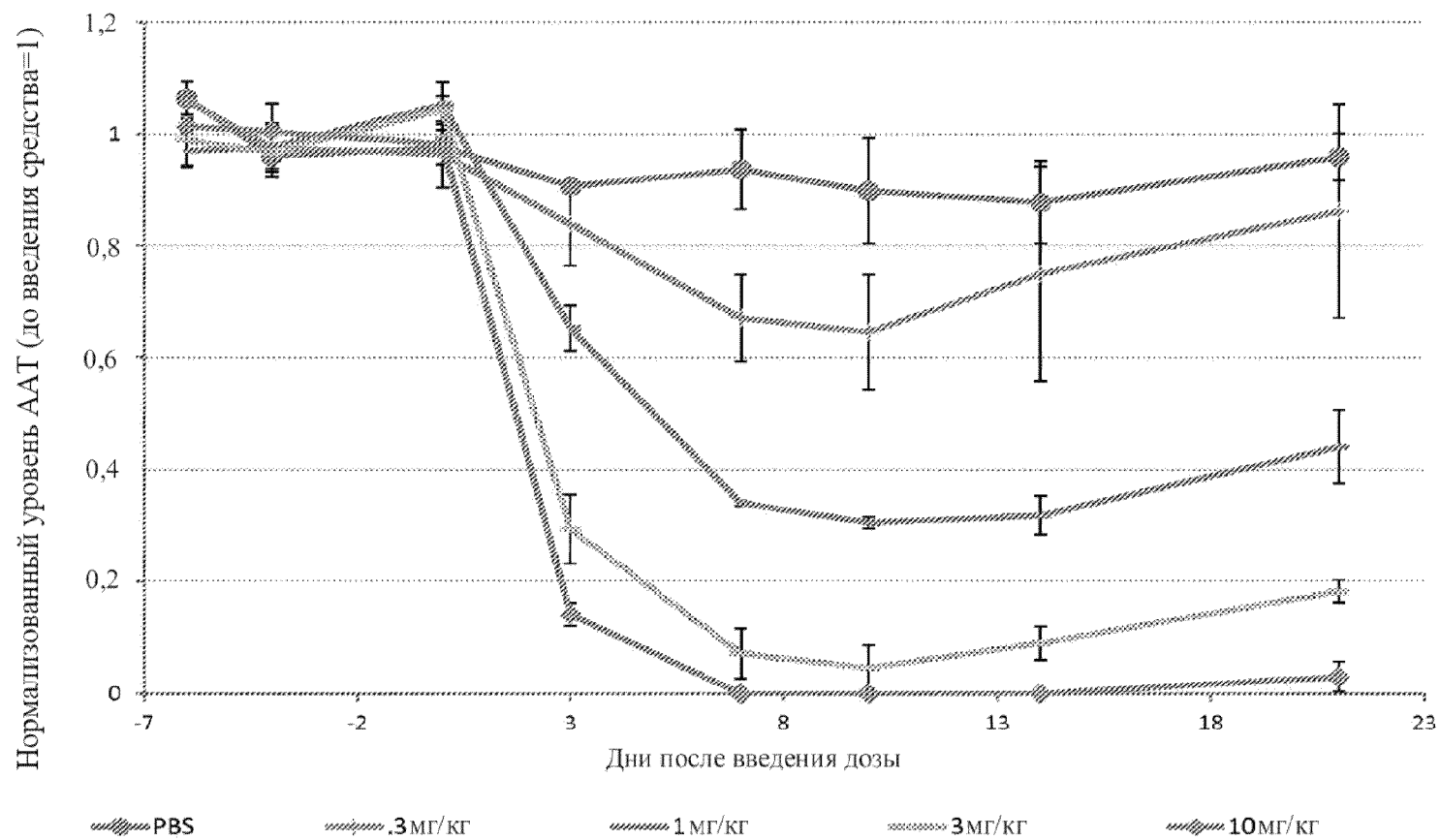


3/42

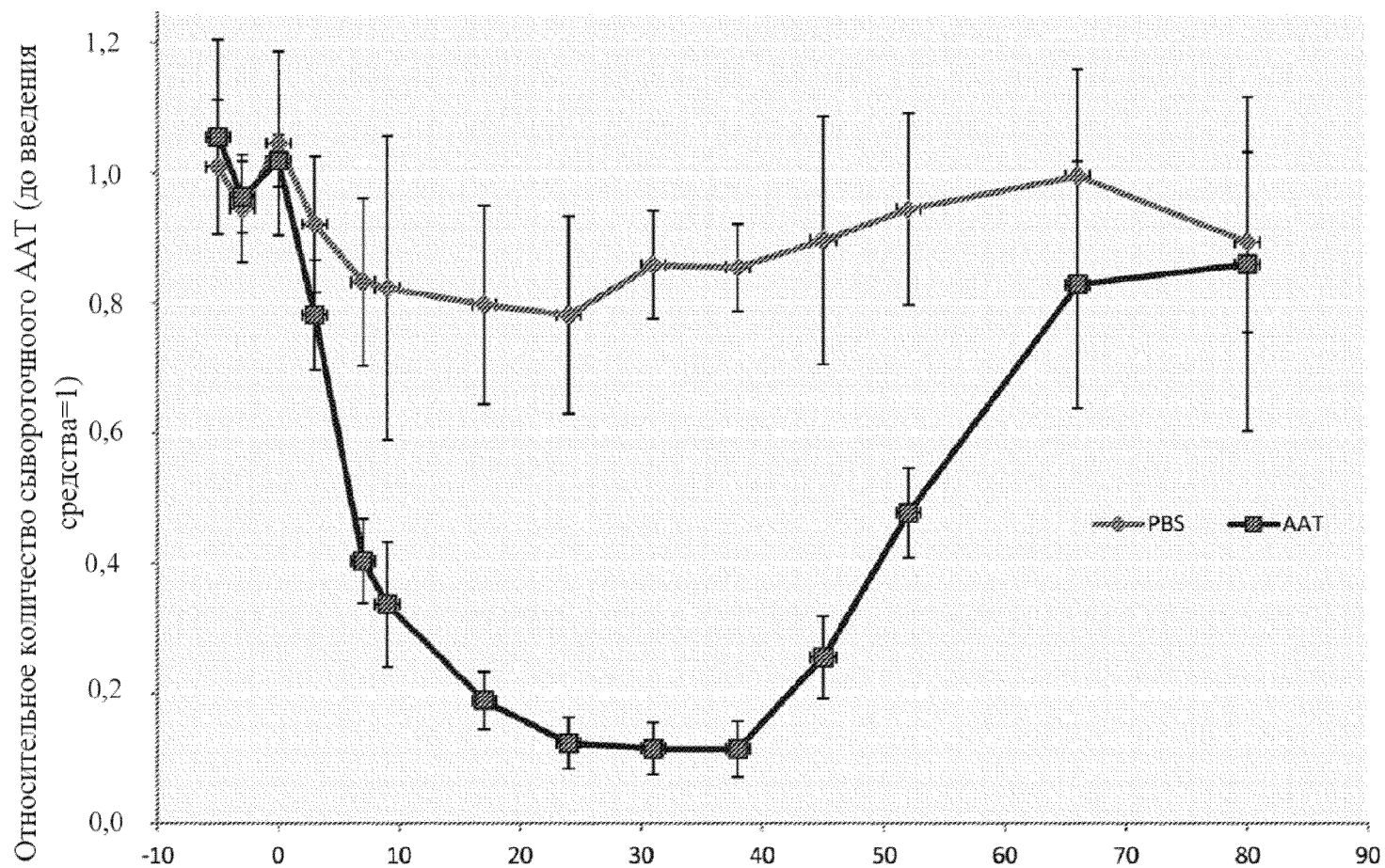
Фигура 2В



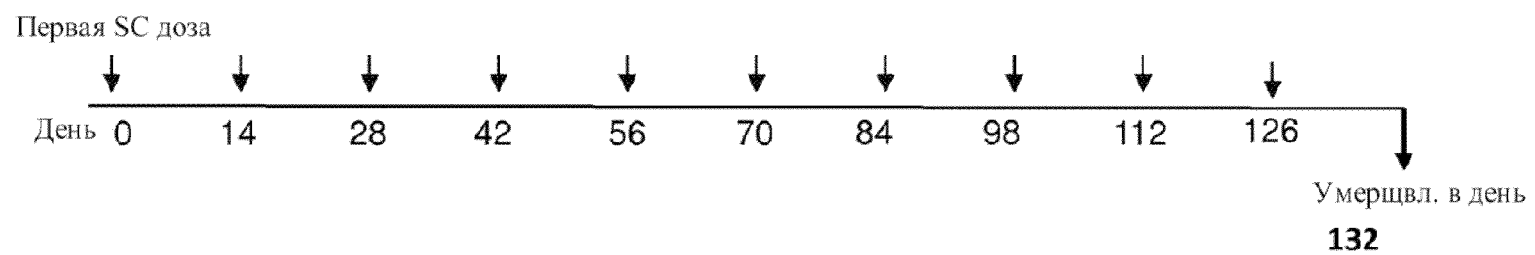
Фигура 3А



Фигура 3В

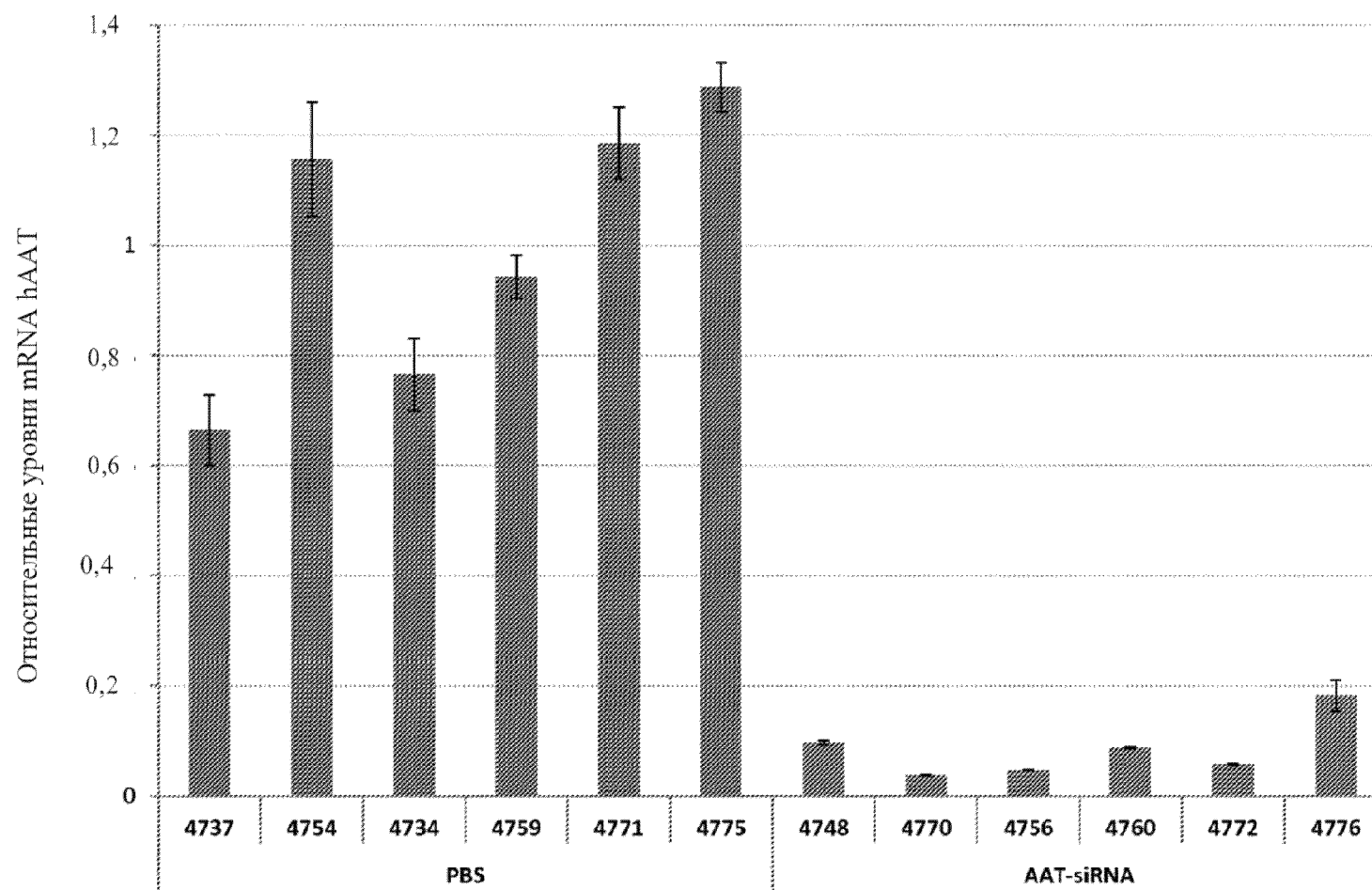


Фигура 3С

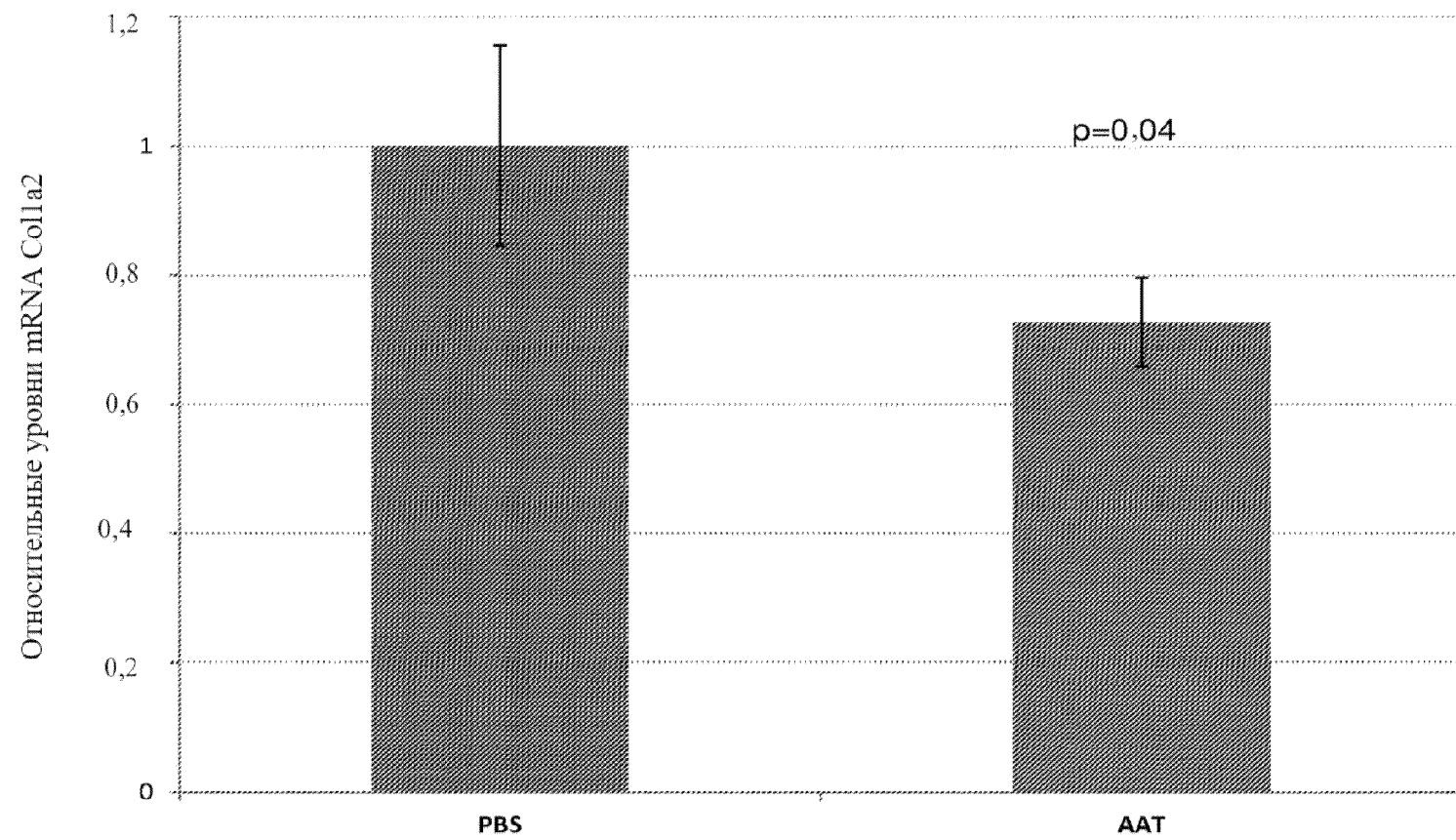


7/42

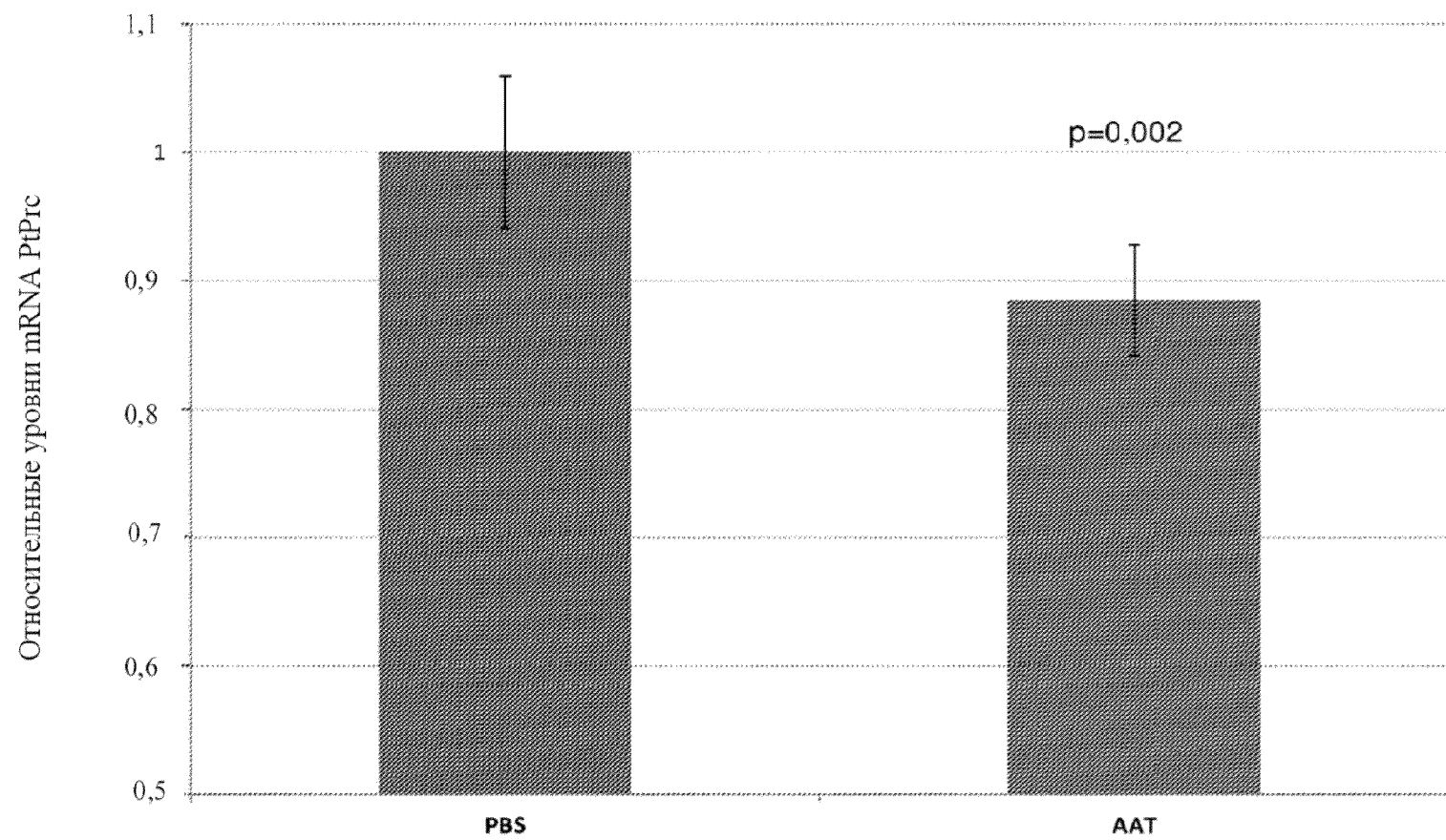
Фигура 4А



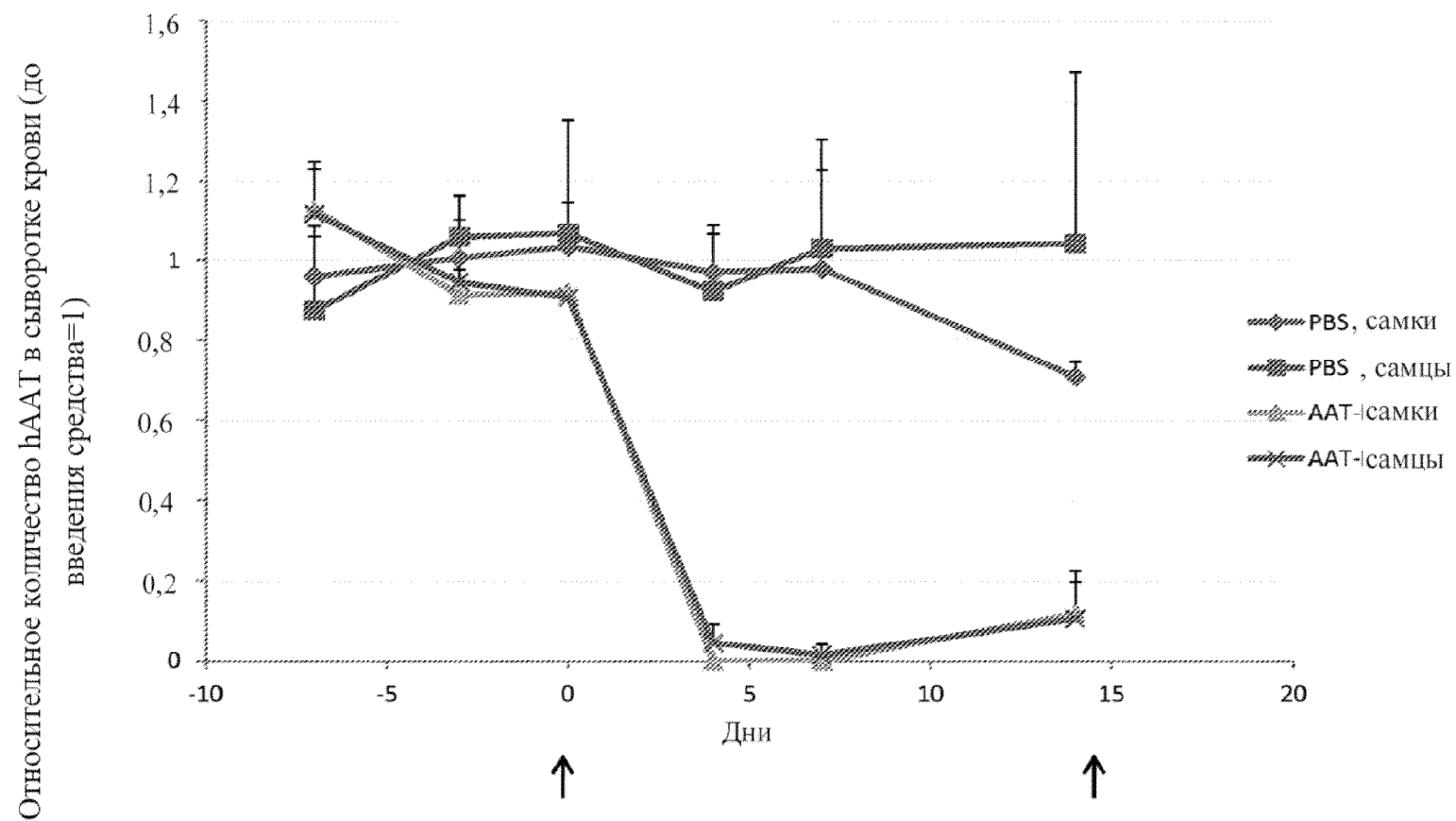
Фигура 4В



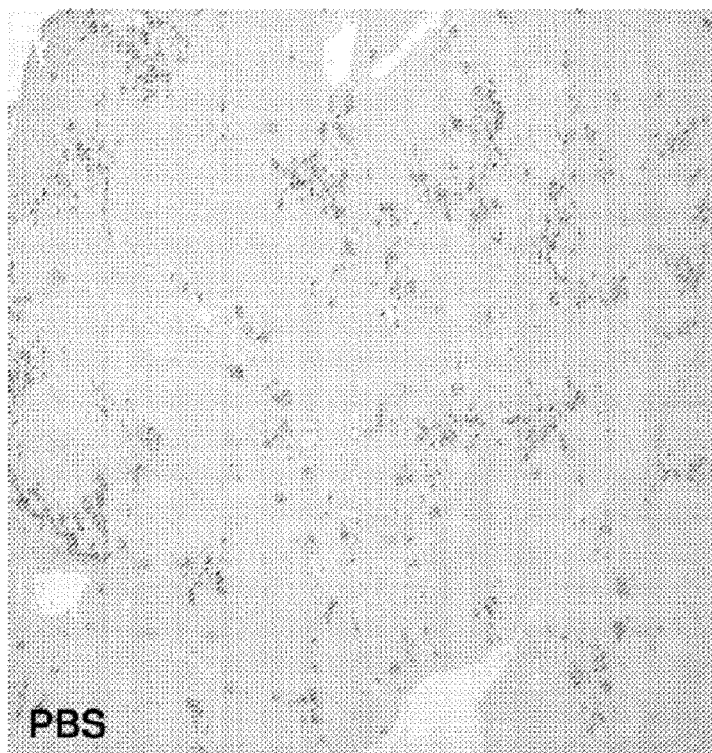
Фигура 4С



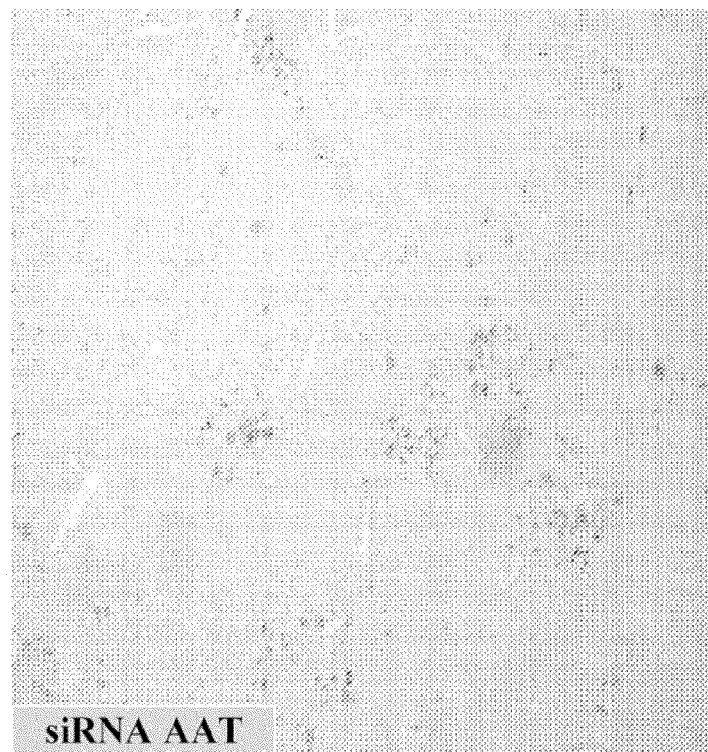
Фигура 4D



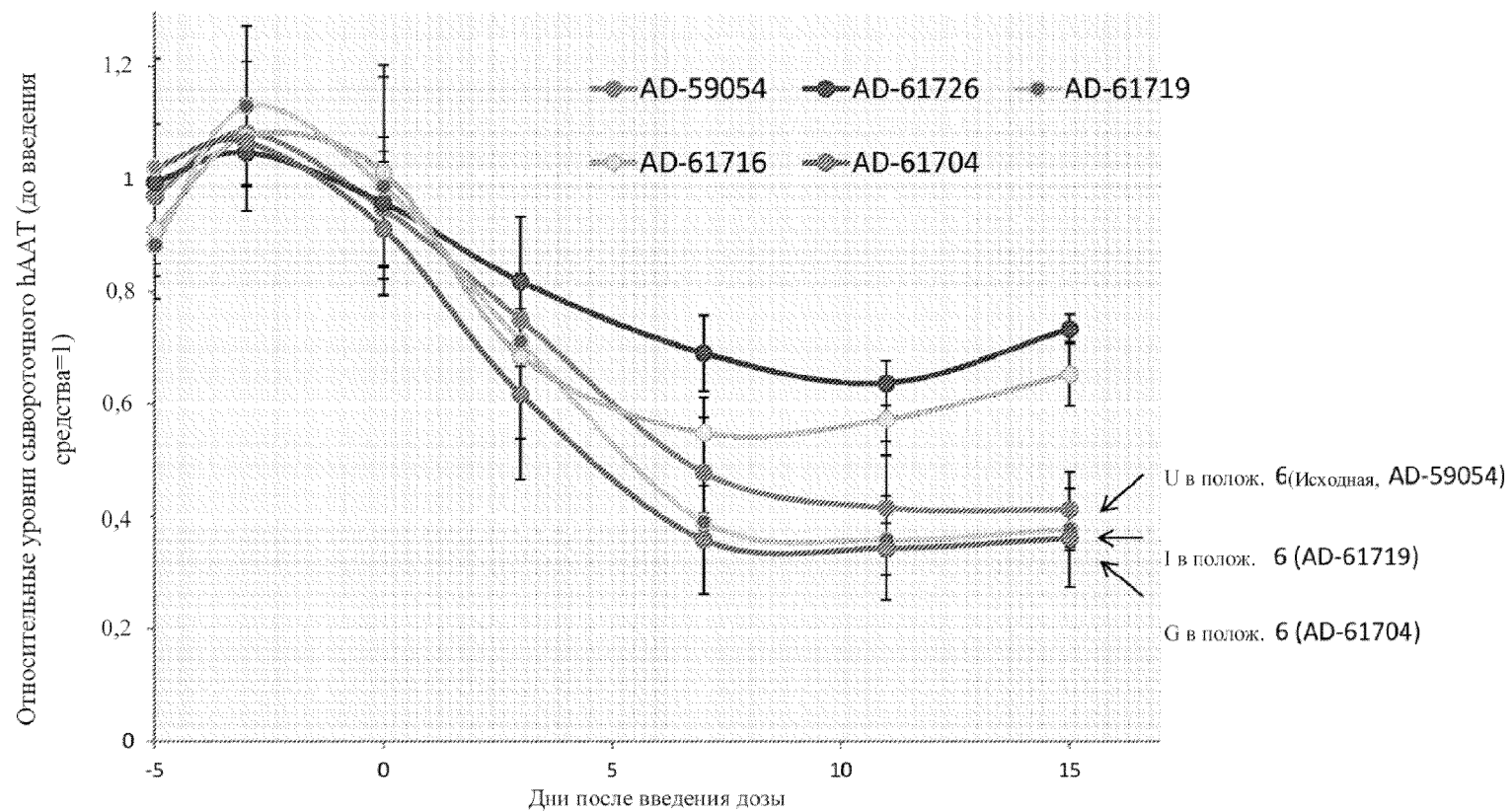
Фигура 5А



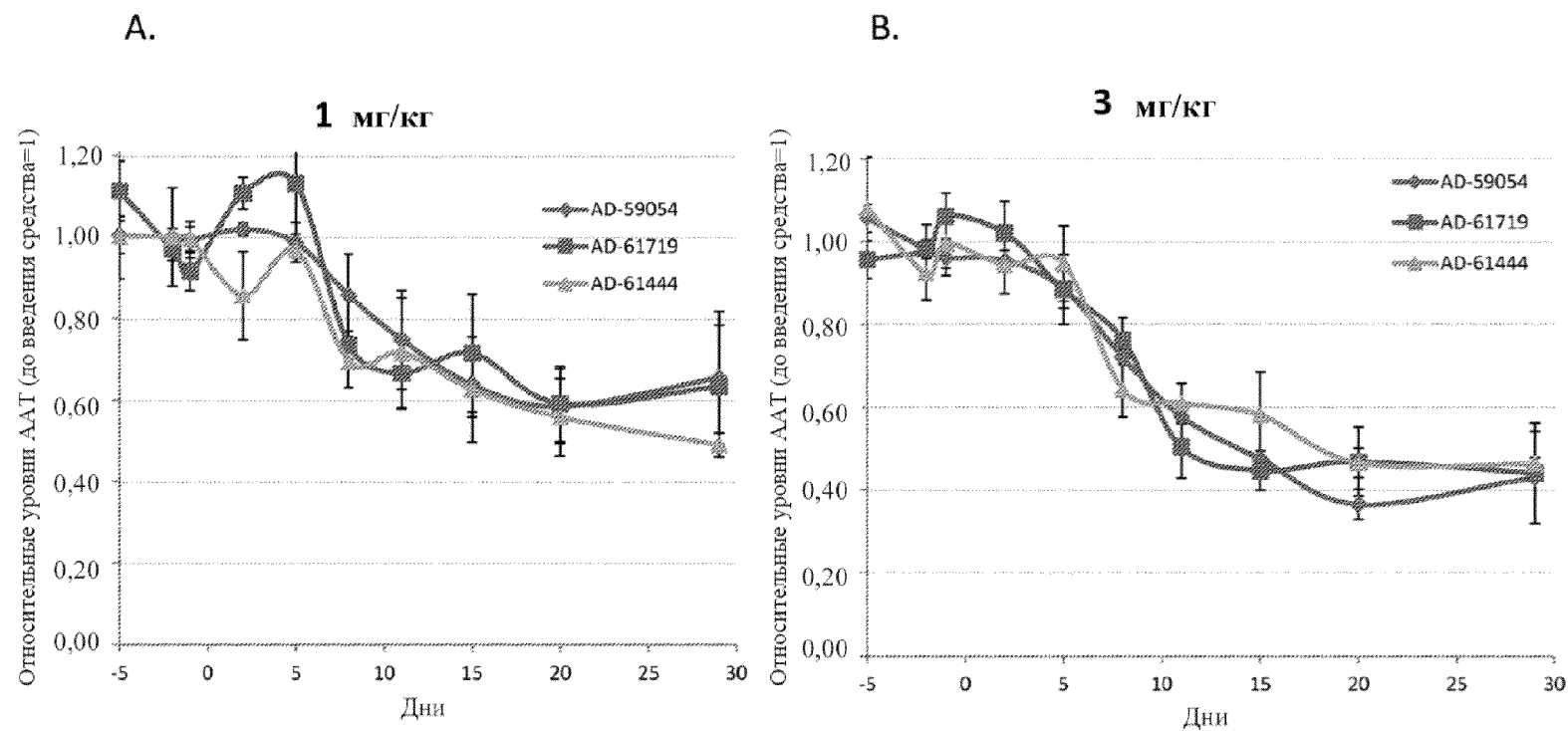
Фигура 5В



Фигура 5С



Фигура 6



Фигура 7

>gi|189163524|ref|NM_000295.4|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 1, mRNA

ACCAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGACGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCCAAAGCGTCCGGGCACCGTAGG
CGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCGTGTTTGTCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGT
TAATATTACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCC
CTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGT
GGGGCATCCTCTGCTGGCAGGCTGTGCTGCTGTGCTCCTGTCTCCTTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGA
TGCTGCCACGAAGACAGATACATCCCACCTATGTCAGGATACCCCACTTCAACAAGATACCCCCAAC
CTGGCTGAGTTTCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
CCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTTGAATGCTCTCCTTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGATGAAA
CCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCAGGAACTC
CTCCGTACCCTCAACAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGCAATGGCCTGTTCCTCAGCGAGG
GCTTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAGTTGTACCCTCAGAAGCTCTACTGTCAA
CTCTCGGGACACCGGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACTGTGAGAGGCTACTCAAGGAAAAATT
GTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTGTGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCA
AATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGGAGTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGT
GAAGGTGCCATATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAATCCAGCACGTGAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTG
CTGCTGATGAAATACCTGGGCATGCCACCGCCACTTCTTCTGCTGATGAGGGGAAACTCAGCACCC
TGAAAAATGAACTCACCAGATATCATCCAAAGTTCTCTGGAAATGAAGACAGAAGTCTGCCAGCTT
ACGTTTACCACAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGCTCTGGGTCAACTGGGCATCACT
AAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCG
TGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCAT
ACCCATGTCATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTCTTAATGATTGAACAAAAATACC
AAGTCTCCCTCTTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAATAACTGCCCTCTCGCTCTCAACCC
TCCCTCATCCCTGGCCCTCTCTGGATGACATTAAGAAAGGTTGAGCTGTGCTCCCTGCCCTGCATGTG
ACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTA
ACAGTGTCTCTTCCGGCCCCCTGAAGTGTGTTTATGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTT
GAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTC
CTTGCTCTGTCTTGAGTGCCTCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACCAGCCATGACCCAGCC
TCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGTCTATCCCCACTCCCCACCCAGCTAGTCTGCTATCTCTGCCA
GGCGTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCTTGGGGGCCCAAGACTGCCTGATCGTGCCGTGGCCCA
GTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTCTTGACCCGCTGTCACTTAACCA
GACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTCTTGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCCATTTCT
CCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCT
CCGTTTAGAATCAGGTCCCTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCTCTC
TCAGACTTGACAGGCCCAGCAGGCCCAAGAACCATTAACCTATATCCCTTCTCTCTCTTACCATACAT
GGCCATAGGCTGTGATGGCTCAGGAAGGCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGACAT
CACCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACT
TCTTTGTGCTGTGTCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCT
GTTCTCTGAATAGCCCTGTGTTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACAC
AGCAGCCAGGAAGTCCCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGCTCTTACCAGGAATGGC
CTTGCTCTATGGAAGGCACGTCCCCATCCCAACTAATCTAGGAATACGTGTAACTCACTCACTGTTCAT
GAAATGTGTAATTAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTCGATAGTTCAAATGGTGAATTA
AGCAATTTACATGATTGAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTA
AGCTTACTCACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCTTAG
GATGACACCCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGCACAGCTGTGTGA
CTTCTGTAAGCGCCAAACCTCTCTGAGCCCGAGTACTGTAGTAAAGCACTGCCCTTTGAGTTGGTATG
ATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATGAAGTCACTTTCTTGGC

Фигура 8А

SEQ ID NO:2

>gi|189163525|ref|NM_001002235.2|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 3, mRNA

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCCTGAGCT
 GAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATCCAGG
 TTGGAGGGGGCGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
 AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAGGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGGCAG
 GCCTGTGCTGCCGTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCGAGGGAGATGCTGCCAGAAAGACAGATAC
 ATCCCAACCATGATCAGGATCACCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTTCCGCTTCAGC
 CTATACCGCCAGCTGGCACACCACTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCAAGTGAAGCATCGCTACAG
 CCTTTGCAATGCTCTCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACAGTGAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAA
 CCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCAGGAACTCCTCCGTACCCCTCAACCAGCCA
 GACAGCCAGCTCCAGCTGACCAACCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGT
 TTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGC
 CAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGGAAAATTTGGATTGGTCAAGGAGCTT
 GACAGAGACACAGTTTTTGTCTGTGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTGAAG
 TCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
 TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGC
 AATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATGAAGTCAACCCACG
 ATATCATCACCAAGTTCTTGAAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCAT
 TACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCT
 GACCTCTCCGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGTGACCA
 TCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCCCGA
 GGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGA
 AAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCC
 TCCTTGGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAATCCCTCCCATGTT
 TTCTGTAGTCTCCCTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGTCTCTTCGGGCCCC
 CTGAACTGTGTTTATGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATC
 CTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCC
 CAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACCAAGATACCAGCCATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTC
 CCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCA
 AGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGGCGTGGCCAGTTTGTGGCATCTGCAGCAA
 CACAAGAGAGAGGACAATGTCTCCTCTTGACCCGCTGTACCTAACCAAGACTCGGGCCCTGCACCTCTC
 AGGCACTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCCATCTCCATGGGGCAACAAGGACACC
 TATCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTT
 CTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCAGC
 AGGCCCCAGAGACCATTACCCTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGC
 TCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCAACCCATTGACCCCCGCAACC
 CCTCCCTTTCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTTGCTGTCC
 CTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCCTGAATAGCCCTGTGG
 TAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGG
 GCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTG
 CCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTGATGAATGTGTACTTAAAGGATGA
 GGTGAGTCAATACCAATAGTGATTTTGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGT
 CTAATCAATGGATAACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTT
 TCACTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATACCAAGCCCTTAGGATGACACCAGACCTGAGAGT
 CTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACC
 TCTCTGAGCCCCAGTCAATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAA
 ATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Фигура 8В

SEQ ID NO:3

>gi|189163526|ref|NM_001002236.2|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 2, mRNA

TGGGCAGGAAC TGGGCACTGTGCCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTCTGAGCT
GAACCAAGAAGAGGAGGGGGTCTGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGA
CGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCCACCACCTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCG
TCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGGCAGGCCTGTGTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGG
ATCCCCAGGGAGATGCTGCCAGAGAAGACAGATACATCCACCAATGATCAGGATCACCCCAACCTTCAACAA
GATCACCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACC
AATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACA
CTCACGATGAATCTCTGAGGGGCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCTCAACAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAACGGCAATGGCCTG
TTCTCAGCGAGGGCCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAG
CCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTAC
TCAAGGAAAAATTGTGGATTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTGTCTGTGTGAATTACATC
TTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACC
AGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAATCCAGCACTGTAAGAGCT
GTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGG
AAACTACAGCAGCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCTGGAAAATGAAGACAGAA
GGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGCTCCTGGGTCA
ACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAG
CTCTCCAGGGCGTGCTAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGT
TTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGAT
TGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAATAACTGCCCTCTC
GCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCC
CTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCCTGCTGAGGCTGTATG
TGGGCTCCAGGTAACAGTGTCTGTCTTGGGCCCCCTGAACCTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGC
ACATGTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAG
GGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACACAGC
CATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCACCCAGAGTT
GCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATC
GTGCCGTGGGCCAGTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTGACCCGC
TGTACCTAACAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCCTTCTGGAATGACTGAGGCAGATTCTTCC
TGAAGCCCATCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAA
GCCTCACATATCTCCGTTTGAATCAGGTCCCTTCTCCCAAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTT
CTCTATCTCTCTCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCATATATCCCTTCTCC
TCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGG
AGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTTGAGTCCCGACTGGGGCCAC
ATGCAGCTGACTTCTTTGTGCCGTGTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCC
ACGGCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCTCCCAAGGCC
TGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTC
TACCAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAATAATCTAGGAATCACTGTCTAAC
CACTCACTGTCTGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTCGATAGTTCA
AAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCACTTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAGTCT
TCCTGTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCA
CCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGCCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCTT
GACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCCGCAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGTAGTAAGACCTGCCCT
TTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAAC
TACATTTCTTGCA

Фигура 8С

SEQ ID NO:4

>gi|189163527|ref|NM_001127700.1|ингибитор серпин лептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 4, mRNA

GAACCAAGAAGGAGGAGGGGCTCGGCCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCACAGGACAATG
CCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTG
AGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACTTCAA
CAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCACTCCAAACAGC
ACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTG
ACACTCAGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGA
AGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGC
CTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAG
AAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGG
TACTCAAGGGAAAAATTGTTGGAATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTCGCTCTGGTGAATTAC
ATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGG
ACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCCTTTAGGCATGTTAATATCCAGCACTGTAAGAA
GCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAG
GGGAACTACAGCACCTGGAATGAATCACTACCCACGATATCATACCAAGTTCTGGGAAATGAAGACA
GAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGG
TCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTG
AAGCTTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTCTGGGGCCA
TGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAAT
GATTGAACAAATACCAAGTCTCCCTCTTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCT
CTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGG
TCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGGCTGCTGAGGCTGT
ATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGTCTTTCGGGCCCTGAACTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTA
GGCATGTCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTG
GAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTCTTGGAGTCCCAAGAAAGGAATCACAGGGGAGGAACACAGATACC
AGCCATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCCACCCAGA
GTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCGTG
ATCGTGCCGTGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGACAATGTCTCTCTTTGACC
CGCTGTACCTAACAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTCTGGGAAATGACTGAGGCAGATTCT
TCCTGAAGCCCATTTCTCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAG
AAAGCCTCACATATCTCCGTTTGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGT
TTTCTCTATCTCTCTCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCCTTC
TCCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCGTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTAT
GGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGC
CACATGCAGCCTGACTTCTTGTGCTGTGCTGCTCCTGCACTCTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGT
GCCACGGCAGGAGGCTGTTCCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCTCTCAAGG
CCCTGTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGT
CTCTACCAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCT
AACCACTCACTGTGATGATGTGACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTCGATAGT
TCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCACTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAA
GTCTCTGTCTCTTAAAGCTTACTCACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCA
TCACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACC TGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCC
CCTGACAGCTGTGTGACCTTCTGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGTCTAGTAAGACCTG
CCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAG
AACTACATTTCTTGCA

Фигура 8D

SEQ ID NO:5

>gi|189163529|ref|NM_001127701.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 5, mRNA

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTGTGAGCT
 GAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTCCGGCCCTCCGAGGAAGGCCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATCCAGG
 TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCCTCTGIGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
 AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCACAGGGCGGCCA
 GTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAGTAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCC
 ACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGC
 CACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTCTGAGCCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGA
 TCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCTGACCTGGGA
 CAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCCTGGTC
 CCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCAGAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGG
 ATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGC
 ACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTCTCCCAAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCC
 CTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGG
 AGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCAGGAATCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCT
 GACCACCGGCAATGGCCTGTCTCCTCAGCGAGGGCCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGAGGATGTTAAA
 AAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACG
 ATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTT
 TGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAAATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAA
 GAGGACTTCCACGTGGACAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCCTTTAGGCATGTTTAAACA
 TCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTT
 CTCTCTGCCTGATGAGGGGAAATACAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAGTTC
 CTGGAATAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATC
 TGAAGAGCGCTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCA
 AGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACT
 GAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAAC
 CCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCAC
 CCAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAA
 AGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTT
 TGCTCTGCTGAGGCTGTATGTGGCTCCAGTACAGTGTCTCTCGGGCCCCCTGAAGTGTGTTCAATGG
 AGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTG
 GGCCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTCTCTTGTCTCTGCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGG
 GGAGGAACCAATACAGCCATGACCCCAAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCA
 CTCCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCCAAGGCTGCCCTCTGGGG
 GCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAA
 TGTCTCTCTCTTGACCCGCTGTCACTAACCCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAAT
 GACTGAGGCAGATTCTCTGAAAGCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTCT
 TCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGG
 AGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCTCTCTCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAAGCCAT
 TACCTATATCCCTTCTCTCTCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCA
 AGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTCTCTCTCT
 GAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGTCTGTCTCTGAGTCTTCAGAGGG
 CCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTCTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCT
 CTTCATCTCTCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGAC
 AGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAACTAAT
 CTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTCTGATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCAATACAAA
 TAGTGATTTCTGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTTACATGATTCAGTCTAATCAATGGATACCG
 ACTGTTTCCACACAAGTCTCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATAC
 ATTAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCA
 AGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCA
 TTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAG
 AACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Фигура 8Е

SEQ ID NO:6

>gi|189163531|ref|NM_001127702.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 6, mRNA

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCCTGAGCT
 GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGG
 TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
 AGGAGAGCTTGAGAGAGCAGGAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCACAGCAGCCTC
 CCCCCTTGCCCCCTTGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGCTCCTCAGCTTCAGGC
 ACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGCTCTCTGCTCTGCTGGGGCATCCTCCTGCTGGCA
 GGCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCTTGCTGAGGATCCCAGGGAGATGCTGCCAGAAGACAGATA
 CATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCTTCAG
 CCTATACCGCCAGCTGGCACACCACTGCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACA
 GCCTTTTGCAATGCTCTCCTTGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCTGAATTTCA
 ACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCCGTACCCCTCAACCAGCC
 AGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
 TTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACCTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGG
 CCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAAATTGTGGATTGGTCAAGGAGCT
 TGACAGAGACACAGTTTTGTCTGCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGGCAAAATGGGAGAGACCCCTTGAA
 GTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGC
 GTTTAGGCATGTTTAAATCCAGCACGTGAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGG
 CAATGCCACCGCCATCTTCTCCTGCCGTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATGAACCTACCCAC
 GATATCATCACCAAGTTCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCA
 TTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTCGGTCAACTGGGCATCACTAAGGCTTCAGCAATGGGGC
 TGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACC
 ATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATACCATGCTATATCCCCCG
 AGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGG
 AAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCC
 CTCCCTGGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCGTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGT
 TTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGTCTGTCTCGGGCCC
 CCTGAACGTGTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAAT
 CCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCCTTGTCCTGTCTTGGAGTCC
 CCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACCAAGATACAGCCATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGT
 CCCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCC
 AAGGCTGCCCTCCTGGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCA
 ACACAAGAGAGAGACAATGTCTCTCTTGACCCGCTGTCACTTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCT
 CAGGCACTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACAC
 CTATTCTGTCCTTTGCTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCT
 TCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCAG
 CAGGCCCCAGAAGACCATTACCTTATATCCCTCTCCTCCTAGTCACATGGCCATAGGCCCTGCTGATGG
 CTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCCGCAAC
 CCCTCCCTTTCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTTGTGCTG
 CCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCCCTGTG
 GTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTG
 GGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCCTATGGAAGGCACT
 GCCCCATCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTCTGAATGTCTACTTAAAGGATG
 AGGTGTAGTCATACCAATAGTGATTTGATAGTTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATCTACATGATTGAG
 TCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCT
 TTCCTCTCCACAATAACATTAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAG
 TCTGAAGACCTGGATCCAAGTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAAC
 CTCTCTGAGCCCCAGTCAATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAA
 AATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

SEQ ID NO:7

>gi|189163533|ref|NM_001127703.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 7, mRNA

```

TGGGCAGGAACTGGGCACTGTGCCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCCTCCGAGGAAGGCCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCAAGTGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTC
TCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGCTTCTGTCTCGTGGGGC
ATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTG
CCGAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTTCGCCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGGCACCCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCCCCA
GTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGG
AGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCGGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCAGGAACCTCCTCG
TACCTCAACCCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCCACGGCAATGGCCTGTCTCAGCGAGGGCCTG
AAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCG
GGGACACCCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGA
TTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTGTGCTGTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCCAATGG
GAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGG
TGCCATATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACGTGAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCT
GATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAA
AATGAACCTACCCACGATATCATCACCAAGTTCTTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATT
TACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGT
CTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCAAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCAT
AAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCA
TGCTATCCCCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGCTCTCTTAATGATTGAACAAAAATACCAAGTC
TCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCC
TCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGT
AAATCCCTCCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGT
GCTGTCTTCGGGGCCCCCTGAACCTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATC
CAGGGGGGACTGTAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGT
CCTGTCTTGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACCAGATACCAGCCATGACCCCAGGCTCCAC
CAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCTTCCAGGGCT
GGCTGTGCCCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATCGTGCCGTGGCCCCAGTTT
GTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTGACCCGCTGTACCTAACCCAGACTC
GGGCCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAAGCCATTCTCCATG
GGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTT
TAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTATCTCTCTCTCAGA
CTTGACCAGGCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCAATTACCTATATCCCTTCTCTCTCTTAGTCACATGGCCA
TAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCC
ATTGACCCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTT
GTGCCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTC
TGAATAGCCCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCTTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAG
CCAGGAAGTCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGT
CCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAACATACTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTCTATGAATG
TGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTCGATAGTTTCAAAATGGTGAAATTAGCAA
TTCTACATGATTCACTTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTT
ACTCACTGACAGCCTTTCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGA
CACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTC
GTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTT
CAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAAATAGAACTACATTTCTTGCA

```

Фигура 8G

SEQ ID NO:8

>gi|189163535|ref|NM_001127704.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротейназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 8, mRNA

TGGGCAGGAAC TGGGCACTGTGCCCAGGGCATGCACTGCCGCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCCTGAGCT
 GAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTTCGGGCCTCCGAGGAAGGCC TAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATCCAGG
 TTGGAGGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
 AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
 TAAATGGTAGATCTTGCTACCAAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
 GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
 TGAGCCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCC
 TCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATC
 CTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCC
 AGAAGACAGATACATCCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGCTGA
 GTTCGCCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCACTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTG
 AGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGG
 GCCTGAATTTCAACCTCAGCGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCCTCCGTAC
 CCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTCCTCAGCGAGGGCCTGAAG
 CTAGTGGATAAGTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGG
 ACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGTA CTCAAGGGAAAATTGTGGATT
 GGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGT TTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGGCAATGGGAG
 AGACCCCTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGGTGACCACCGTGAAGGTGC
 CTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGAT
 GAAATACCTGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAAAT
 GAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCTGGAAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTAC
 CCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTT
 CAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAG
 GCTGTGCTGACCATCGACAGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGT
 CTATCCCCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCC
 CCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCCTCTCGCTCTCAACCCCTCCCTCC
 ATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAAA
 TCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGCT
 GTCTTCGGGGCCCCCTGAACCTGTGTTCATGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATCCAG
 GGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCCATCTGTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTCTGTCT
 GTCTTGGAGTCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGCCATGACCCAGGCTCCACCAA
 GCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCTGCCAGGGCTGGC
 TGTGCCCAACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACGCTGATCGTGCCGTGGCCAGT TTTGTG
 GCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTCTTGACCCGCTGTACCTAACAGACTCGGG
 CCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAAATGACTGAGGCAGATTCTCTCTGAAGCCCATCTCCATGGGG
 CAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAG
 AATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGTCTCTGCTTTGTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTT
 GACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAAGACATTACCCCTATATCCCTTCTCCTCCTAGTCACATGGCCATAG
 GCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATT
 GACCCCGCCCAACCCCTCCCTTTCTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTG
 CCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCCTGA
 ATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAGGACACAGCAGCCA
 GGAAGTCCCTTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCT
 ATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTCTGAATGTGT
 ACTTAAAGGATGAGGTGAGTCAATACCAATAGTGATTTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTC
 TACATGATTCACTTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACT
 CACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGACAC
 CAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTG
 AAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCAATTGCTAGTAAGACCTGCCCTTGAGTTGGTATGATGTTCAA
 GTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Фигура 8H

SEQ ID NO:9

>gi|189163537|ref|NM_001127705.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 9, mRNA

TGGGCAGGAAC TGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCC TCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCTTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCAAGTGGAAACGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGA
GGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCT
TCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCTGTGTCTGCCTGGTCCCTGTCTCCTGGCTGAGGATC
CCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCCAACTTCAACAAGAT
CACCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCTTCAGCCTATACGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAAT
ATCTTCTCTCCCAAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTCGAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTC
ACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCAGGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTT
CCAGGAACCTCCTCCGTACCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTC
CTCAGCGAGGGCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTIAAAAAGTTGTACCCTCAGAAGCCT
TCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCA
AGGGAAAATTGTGGATTGTGTCAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTGTCTCTGGTGAATTACATCTTC
TTTAAAGGCAATGGGAGAGACCTTTGAAGTCAAGGACACCAGGAAAGGACTTCCACGTGGACCAGG
TGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTC
CAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTCCTGCCTGATGAGGGGAAA
CTACAGCACTGGAAAATGAACCTACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGT
CTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACT
GGGGAATCAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCCACCCCTGAAGCTC
TCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTT
TAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGA
ACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAGTGGTGAATCCACCCAAAATAACTGCCTCTCGCT
CCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTG
CCTGCATGTGAGCTGTAAATCCCTGCCATGTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTAGTGG
GCTCCAGGTAACAGTGTGTCTTCGGGCCCTGAACTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGACACA
TGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGGCCATCTGTTTCTGGAGGGC
TCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACCAGCCAT
GACCCCAAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCT
CATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCGTGATCGTG
CCGTGGCCCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTTGACCCGCTGT
CACCTAACCAAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTCTGA
AGCCCATCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCC
TCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTC
TATCTCTCTCTCAGACTTGACCAGGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCCTTCTCTCTCC
CTAGTCACATGGCCATAGGCCTGTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGA
GGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATG
CAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACG
GCAGGAGGCTGTCTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCTCCAAAGGCCCTGC
TAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTAC
CAGGAATGGCCTTGTCTTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCAC
TCACTGTCTATGAATGTGTAATTAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTCTGATAGTTCAAAA
TGGTGAATTAGCAATTCTACATGATTCACTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCC
TGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACCTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCA
AGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGAC
AGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTG
AGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTAC
ATTTCTTGCA

SEQ ID NO:10

>gi|189163539|ref|NM_001127706.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада А (альфа-1 антипротейназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 10, mRNA

TGGGCAGGAACCTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCGCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTGGGCCCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGG
TTGGAGGGGGCGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGA
CGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCG
TCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGGCAGGCCCTGTGCTGCCGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGG
ATCCCCAGGGAGATGTGCCAGAAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAA
GATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACC
AATATCTTCTTCTCCCGAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACA
CTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTG
TTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTGTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAG
CCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTAC
TCAAGGGAAAAATGTGGATTGTGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTGTCTGGTGAATTACATC
TTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACC
AGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTAATATCCAGCACTGTAAGAAGCT
GTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTCTCTGCTGATGAGGGG
AAACTACAGCAGCTGGAAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAGTTCCCTGGAAAAATGAAGACAGAA
GGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTCTGGGTCA
ACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAG
CTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGT
TTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGAT
TGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCTCTC
GCTCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCC
CTGCTGCTGCTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATG
TGGGCTCCAGGTAACAGTGTCTTCCGGGCCCTGAACTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGC
ACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAG
GGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGC
CATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCTGTCTCATCCCCACTCCCCCACCAGAGTT
GCTCATCTCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCGGGGGGCCAGAACTGCCTGATC
GTGCGTGGGCCAGTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTGTACCCGC
TGTCACCTAACAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTTCTGGAATGACTGAGGCAGATTCTTCC
TGAAGCCCATTTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAA
GCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTT
CTCTATCTCTCTCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCCTTCTCC
TCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGG
AGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCAC
ATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACGGCAGGAGGCTGTTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAGGCC
TGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTC
TACCAGGAATGGCCTTGTCTTATGGAAGGCCTGCCCCATCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAAC
CACTCACTGTGATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTCTGATAGTTCA
AAATGGTGAATTAGCAATTCTACATGATTCACTTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTC
TCTGTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCA
CCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCT
GACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCT
TTGAGTTGGTATGATGTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAAC
TACATTTCTTTGCA

Фигура 8J

SEQ ID NO:11

>gi|189163541|ref|NM_001127707.1|ингибитор серпин пептидазы Homo sapiens клада A (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1), вариант транскрипта 11, mRNA

TGGGCAGGAAC TGGGCACTGTGCCCAGGGCATGCACTGCCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGCTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGA
GGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCT
TCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGTGGCAGGCCGTGTGTGCCTGGTCTCCTGTCTCCTGGCTGAGGATC
CCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGAT
CACCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCCCTCAGCCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAAT
ATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTC
ACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCGGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTT
CCAGGAACTCCTCCGTACCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGCAATGGCCTGTTC
CTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCT
TCACCTGCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCA
AGGGAAATTTGTGGATTGTGTCAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGTGTGAATTACATCTTC
TTTAAAGGCAAA TGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGG
TGACCACCGTGAAGGTGCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTC
CAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAAA
CTACAGCACCTGGAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAGTTCTCTGGAAATGAAGACAGAAGGT
CTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACT
GGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTC
TCCAAGGCCGTGCATAAGCCTGTGTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTT
TAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTGTCTTCTTAATGATTGA
ACAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCTCTCGCT
CCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTG
CCTGCTGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCTGCTGAGGCTGTATGTGG
GCTCCAGGTAACAGTGCTGTCTTCGGGGCCCCCTGAACCTGTGTTTCAATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACA
TGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGGCCATCTGTTTTCTGGAGGGC
TCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACCATACAGCCAT
GACCCCAAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCT
CATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTG
CCGTGGCCCAAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTCTTGACCCGCTGT
CACCTAACCAAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTTCTGGAAATGACTGAGGCAGATTCTCTCTGA
AGCCCATTTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCC
TCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTC
TATCTCTCTCTCAGACTTGACCAAGGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCCTTCTCTCTCC
CTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGA
GGAAGCACATCACCAATTGACCCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATG
CAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGTGTCTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACG
GCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGC
TAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTAC
CAGGAATGGCCTTGCTCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAATCTAGGAATCACTGTCTAACCCAC
TCACCTGTCATGAATGTGACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAATAGTGATTTGATAGTTCAAAA
TGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCACTTAATCAATGGATACCGACTGTTCCACACAAGTCTCTC
TGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACCTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCA
AGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGAC
AGCTGTGTGACCTTCTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTG
AGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAATACTAC
ATTTCTTGCA

Фигура 8K

SEQ ID NO:12

>gi|402766667|ref|NM_001266017.2|ингибитор серпин пептидазы *Macaca mulatta*
клада А (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин), представитель 1 (SERPINA1),
mRNA

CAGGACAATGCCATCTTCTGTCTCATGGGGCGTCCCTCTGCTGGCAGGCCGTGCTGCCTGCTCCCCGGC
TCTCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACGGATACATCCCACCATGATCAGGACCACC
CAACCCCTCAACAAGATCACCCCCAGCCTGGCTGAGTTCGGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCA
GTCCAACAGCACCAATATCTTCTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGG
ACCAAGGCTGACACTCACAGTGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACGTACCGGAGATTCCGGAGGCTC
AGGTCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCCATACCCCTCAACAAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAC
CGGCAACGGCCTGTTCTCAACAAGAGCCTGAAGGTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTCAAAAACTG
TACCACTCAGAAGCCTTCTCTGTCAACTTTGAGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACAATTACG
TGGAGAAGGAACTCAAGGAAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTI
GGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGACGTTGAGGCCACCAAGGAAGAGGAC
TTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCCATGATGAGGCGTTTAGGCATGTTTAACATCTACC
ACTGTGAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCT
GCCTGATGAGGGGAACTGCAGCACCTGGAAAAATGAACTCACCCATGATATCATCACCAAGTTTCTGGAA
AATGAAAACAGCAGGTCTGCCAACTTACATTTACCCAGACTGGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGA
CAGTCCTGGGCCACCTGGGTATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCGGGGATCACGGAGGA
GGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGATGAGAAAGGGAAGTGAAGCT
GCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATACCCATGCTATTCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTG
TCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAGAA
ATAACTGCCTGTCACTCCTCAGCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGAATGACAT

SEQ ID NO:13

>gi|297298519|ref|XM_001099255.2|ПРЕДСКАЗАННАЯ: ингибитор серпин
пептидазы *Masaca mulatta* клада A (альфа-1 антипротейназа, антитрипсин),

представитель 1, вариант транскрипта 6 (SERPINA1), mRNA

GCCCAGTCTTGTGTCTGCTGGCAATGGGCAAGGCCCTTCTGCCCCAAGTCCCCGCCCCCTCCCAACC
TATTGCTCCCGCCACCCGCCACCCGAGGCCAATTCTCTGGGTGGGCAGGAAGTGGGCCCTGTGCCAGGG
CGTGCACTGCCTCCACGCAGCAACCTCAGAGTACTGAGCTGAGCAAAGGAGGAGGAGGGGATCAGCACT
CTGAGGAAGGCCTAGCCACTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGGGCGGCATCAGTCTTCAGCATCAGGCATT
CGGGGTGAATTAGTAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCGCTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCA
GAGGGCCAGCAAAGTGGTACTCTCCACGCGACTGGCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACGCAGG
ACACTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTGGTACGTGCAGTGGAGGCTGTATGCTGCTCAG
GCAGAGCGTCCGGACAGCGTGGGCGGGCGACTCAGCGCCAGCCTGTGAACCTTAGTCCCTGTTTGCTCCT
CCGGTAACTGGGGTGATCTTGGTTAATATTACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGCACCCACTGCT
TAAATACGGACAAGGACAGGGCTCTGTCTCCTCAGCCTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACGGTGAATC
GACAATGCCATCTTCTGTCTCATGGGGCGTCTCTCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCGTCTCCCCGGCTCT
CTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCAGAAAGACGGATACATCCCACCATGATCAGGACCACCCAA
CCCTCAACAAGATCACCCCGAGCCTGGGTGAGTTCGGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTC
CAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACC
AAGGCTGACACTCACAGTGAATCTTGSAGGGCCTGAATTTCAACGTCACGGAGATTCGGGAGGCTCAGG
TCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCATACCTCAACAAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGG
CAACGGCCTGTTCTCAACAAGAGCCTGAAGGTAGTGGATAAGTTTGGAGGATGTCAAAAACTGTAC
CACTCAGAAGCCTTCTCTGTCAACTTTGAGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACAATTACGTGG
AGAAGGAACTCAAGGGAAATTTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGGT
GAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTTGACGTTGAGGCCACCAAGGAAGGACTTC
CACGTGGACCAAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCCATGATGAGGCGTTAGGCATGTTTAAACATCTACCACT
GTGAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCC
TGATGAGGGGAACTGCAGCACCTGGAAATGAACCTACCCATGATATCATCACCAGTTCCTGGAAAT
GAAAACAGCAGGTCTGCCAACTTACATTTACCCAGACTGGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGACAG
TCCTGGGCCACCTGGGTATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCGGGGATCACGGAGGAGGC
ACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGATGAGAAAGGACTGAAGCTGCT
GGGGCCATGTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATTCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTTGCTCT
TCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAGAAATA
ACTGCTGTCACTCCTCAGCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGAATGACATTAAAGAAGGGTT
GAGCTGGTCCCTGCCTGCGTGTGTGACTGCAAAAC

Фигура 8М

SEQ ID NO:14

>gi|297298520|ref|XM_001099044.2|ПРЕДСКАЗАННАЯ: ингибитор серпин
пептидазы Масаса mulatta клада A (альфа-1 антипротеиназа, антитрипсин),

представитель 1, вариант транскрипта 4 (SERPINA1), mRNA

TCTTGTGTCTGCTGGCAATGGGCAAGGCCCTTCTGCCCCAAGCTCCCGCCCCCTCCCCAACCTATTGCTCCGCCACCCGCCACCCGAGGCCAACTTCTGGGTGGGCAGGAAGCTGGGCCCTGTGCCCAGGGCGTGCACTGCTCCACGCAGCAACCTCAGAGTACTGAGCTGAGCAAGGAGGAGGGGATCAGCACTCTGAGGAAGGCCTAGCCACTGCTGCTGCCAGGAATCCAGGACAATGCCATCTTCTGTCTCATGGGGCGTCTCTCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCCTGCTCCCCGGCTCTCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACGGATACATCCCACCATGATCAGGACCACCCAACCTCAACAAGATCACCCCCAGCCTGGCTGAGTTCTGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACAGTGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACGTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGGTCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCTCCATACCTCAACAAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAACGGCCTGTTCTCAACAAGAGCCTGAAGGTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTCAAAAACTGTACCACTCAGAAGCCTTCTCTGTCAACTTTGAGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACAATTACGTGGAGAAGGAACTCAAGGGAAAAATTGTGGATTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCTTTGACGTTGAGGCCACCAAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCCATGATGAGGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCTACCACTGTGAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAACTGCAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCATGATATCATCACCAAGTTCTGGAAAATGAAAACAGCAGGTCTGCCAACTTACATTTACCCAGACTGGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGACAGTCTTGGGCCACCTGGGTATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCGGGGATCACGGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGATGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAAATACCAAGTCTCCCCCTCTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAGAAATAACTGCCTGTCACTCCTCAGCCCCTCCCTCCATCCC

SEQ ID NO:15

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:1

TGCAAGAAATGTAAGTTCTATTTATTCTCTGTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTCAAGGGGAAAAGTCAGAAGTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTCAACATTTTGAACIA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCTTTAAGTACACATTCATGACAGTGAAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCCCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTCTCAGCTAGGGGCCAGGGGACTTCTGGCTGCTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTAGGAACAGCCCTCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCCGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCCCTGCAATGGCCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATAGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATGTCTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACCTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCCTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCAATGGCTGGTATCTGGTTCTCCCTCTGGTATTCCTTCTTGGGACTCCAAGACAGGACAAAGGAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTCACTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
 TGTGCCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAAGGGGCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTTCTTAATGTCTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCTGATGGTCAGCACAGCCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCCTCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGTGGATGTTAAACATGCCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCCCAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAAACCTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACICAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTCAAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGTGTAATTAACCAAGGTACCCCAAGTTATCGGAGGAG
 CAAACAGGGGCTAAGTCCACTGGCTGGGATCTGAGTCGCCCGCTACGCTGCCCGGACGCTTTGCCCTGGGCAGT
 GTACAGCTTCACTGCACTTACCGAAAGGAGTCATTGT

SEQ ID NO:16

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:2

TGCAAGAAATGTAGTTCATTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATTCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTCCAGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTCAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCCATTTTGAACATA
 TCGAATCACTATTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCITCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCTGGCTGCTGTGTCCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTAGGAACAGCCTCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAGTCAGGCTGCATGTGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCAATGGCCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTTCTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACCTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTGTTCAATCATTAAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGTAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCCTCAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCCAGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCCCTCTTCTCGGTGTCCTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCCGTGT
 CCCCGAAGTGAACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACCTTACCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCCTTTCTGTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCCGTAAGGC
 TGGCAGGAGGTTGGCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGCCCGA
 CCCCCTCTCTCTTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAG
 TGCCCAGTTCTGCCCA

SEQ ID NO:17

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:3

TGCAAGAAATGTAGTTCATTATTTCTGTCTAATGGGATATAAACATTTTGTATCTAACTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTGAGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTGTGGGAGAGTGAAAGGCTGTGAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTCAACCATTTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCCTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGACAGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGTGTCTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCCTCCTGCCGTGGCAGTGGAGCTGCCGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGTCATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCCCTTGAATGGCCCTT
 CCTGAGCCCATCAGCAGGCCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAAATAGGTGTCC
 TTGTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAATCGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCTAGGCTGGTATCTGGTTCTCCCTGTGATTCTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAAGCTGAGGATTTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCTTCTTTAATGTCAATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGACCGAGAGCCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTGTTCATCATTAAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGTAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCGTCTTCATTTTCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTTATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCCTCGGTGTCTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCCAGAAGTTCAGAGTGAAGGCTTCAGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCCAAAAACCTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGATCTCCGTGAGGTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTACGCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCAGTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTCACTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTGTCCTGATTATAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCGAAAGGAGTCATTGTACCTGGCTCAGAAACACAGCGTCC
 TGTGTCCAAGGTGGAGGGGGTGGCGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCCTTAGCTGGCCCTCTGCTCT
 CACTGCAGAATCCTTAGTGGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGA
 TGCTGAAGACTTACTGCCGCCCTTTCTGTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTCTGGCAGGCACA
 GGAGAGTGGCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGTAGG
 CCTCTCTCGAGGGCCGACCCCTCCTCTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAG
 TGCATGCCCTGGGCACAGTGCCAGTTCTCTGCCA

SEQ ID NO:18

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:4

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTCAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTCTCAGCTAGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGAGGATGGAAG
 GACTCTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTGAGGAACAGCCCTCTGCCGTGGCAGTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGTCATGGGTGATGTGCTTCTCTCCATAGCTGAGGAGTCTTGCAATGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTTCACTCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCAGAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGCTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACCTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGAGG
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCTCTCCCTGTGATTCTTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTGAGGGGGCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCCTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTCTTGGCCCTCTTCGGTGT
 CCCCCAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGTGCTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCCTGGAAGCCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTACGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTAATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCTGTGGAACAGTGAGTGAGCAGCAGCAATGTCCACCTTTCTGCTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCT
 GTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCCT
 GGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGCCGACCCCTCTCTCTTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAG
 GGTGCTGCGTGGAGGCAGTGATGCCCTGGGCACAGTGCCAGTTCTTGCCCA

Фигура 8R

SEQ ID NO:19

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:5

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAGGCTGTCAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAAATTCACCATTTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTCATGACAGTGAGTGTTAGACAGTG
 ATTCTTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCCTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGAGGAGTGAAG
 GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACGGAACAGCCTCTGCGGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCATAGCTGAGGAGTCCTTGCAATGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTTCTATCTGGGAGAA
 GGACCTGATCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTCCAGAAGTGCCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACITGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCTCCCTGTGATTCTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCCAGGTCCGTAAAGCTGAGGATTTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCCATCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTTCTTTAATGTCAATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGCAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTCACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTTAAGAAGA
 CAAAGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATGTGTAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCAGCTGGAAGTCCCTCTCTCGGTGTCTTGAATCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCCAGAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCTGAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTTGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTCGTCCGTATTTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCCCTGTGTCCAAGGTGGAGGG
 GGTGGCTGAGTCAAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCCTTAGCTGGCCCTCTGCTCTCACTGCAGAACTCCTTAGT
 GGCTGTTCCTGTTAGCAAGATCTACCATTTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGATGCTGAAGACTTACTGCC
 GCCCTGTGGAAGTGAAGTGAAGCAGCAGCAATGTCCCACCTTCTCTGCTCTCCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCT
 GTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACTGGAATTCCT
 GGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCCTTCTCGGAGGGCCGACCCCTCTCTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAG
 GTTGCTGCTGGAGGCAGTGATGCCCTGGGCACAGTGCCCATGTTCTGCCCCA

Фигура 8S

SEQ ID NO:20

Последовательность, обратнo комплементарная SEQ ID NO:6

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTCAAGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGCTCTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTCTAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTGGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCCTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTCTCAGCTAGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGTGTCTCTTAGCAGGGCCTTGAGGATGGAAG
 GACTCTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTCAAGAACAGCCTCCTGCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGTCATGGGTGATGTCTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCAATGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCTGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCTCCTCTTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCCATGAGAAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGCTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTGTGTGTGCTGCAGATGCCA
 CAAACTTGGGCCACGGCAGATCAGGCAGTCTTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCTCTCCCTGTGATTCTCTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTCACTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTCAGGGGGCCCCAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACTGCAGGCAGGGAGCC
 AGCTCAACCCCTCTTTAATGTCTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGGAG
 TTATTTTGGGTGGGATTCAACCACTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGCTTCAGGGGTGCTCCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCCAGTTGACCCAGGAGCCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGACTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCCCAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCTCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTACGCCTTGGTCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAATCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCCAGGTCACTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGAGGCTGCTGTGGAACAGTGTAGCAGCAGCAGCAATGTCCACCTTT
 CCTGCTCTCCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCTCTCTCTCTGCGCAGGCACAGGAGAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGG
 AGGTTGCGCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGCCCGACCCCTC
 CTCCTTCTTGGTTACAGTCAAGGACTCTGAGGCTTGTCTGCGTGGAGGAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGCCACG
 TTCCTGCCCA

Фигура 8Т

SEQ ID NO:21

Последовательность, обратнo комплементарная SEQ ID NO:7

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTATCTCTGTTCTAAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATAT
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTGAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGGAGAGTGAAGGCTGTGAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTCATGACAGTGAGTGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGGAGCA
 GGCTGTCTCTCAGCTAGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTCTCTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTAGGAACAGCCCTCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCCGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGAATGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTTCTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCGTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTGTGTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACCTGGGCCACGGCAGATCAGGCAGTCTTGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCTAGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGGCCAGGTCCGTAAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
 TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAAGCCCTTCTTTAATGTCTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTTAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCTGATGGTCAGCACAGCCCTTATGCACGGCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCCTCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCAATTTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCCCTCGGTGTCTTGAAGTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCCAGAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACTTTTAAACATCCTCCAAAACCTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTCGAAGCCTTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATGCTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTGTAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGTTGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTGTCGCTATTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTGTGTCCAAGGTGGAGGG
 GGTGGCGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCCTTAGCTGGCCCTCTGCTCTCACTGCAGAACTCTTAGT
 GGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGATGCTGAAGACTTACTGCC
 GCCCTTTCTGCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGGTGGCTGAAGGC
 TGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGCCCGA
 CCCCCTCTCTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCTGGAGGAGTGCATGCCCTGGGCACAG
 TGCCAGTCTCTGCCCA

Фигура 8U

SEQ ID NO:22

Последовательность, обратнo комплементарная SEQ ID NO:8

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTTCAGGGGAAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTTCAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCCTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTCTCAGCTAGGGGCCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCCGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCAATGGCCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCCTCAGTCATTTTCAGAAAGTGCCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTGTGTGTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACATGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCTCTCCCTGTGATTCTTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
 TGTGCCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTTCTTAATGTCTATCCAGGGAGGGGGCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGGAGGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTTCGATGGTTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCCTCCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTTCAGCCCATTTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACTTGGTG
 ATGATATCGGTGGGTGAGTTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCCTCTTCGGTGT
 CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGCGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTCGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGACGCTTGGTCCCAGGGAGAGCATTGCAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACAGGCAGCACAGGCCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCCAGGTCAGTGGTGGTGCCTGAAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGAGGCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTGTGTCCAGGTGGAGGGGGT
 GCGGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCACCTAGCTGGCCCTCTGTCTCACTGCAGAATCCTTAGTGGC
 TGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGATGCTGAAGACTTACTGCGGCC
 CTTTCTGTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGCTGG
 CAGGAGGTTTCCCGCCCTCCAACTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCCTTCTCGGAGGCCGACCC
 CCTCCTCCTTCTTGGTTTCAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGC
 CCAGTTCCTGCCCA

Фигура 8V

SEQ ID NO:23

Последовательность, обратнo комплементарная SEQ ID NO:9

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTCAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCCTTCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCCCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCCTTGAGGATGGAAG
 GACTCTCCTTGCCCTTACCACAGGGGCTATTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCCGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCCTTGCAATTGGCCTT
 CTTGAGCCATCAGCAGGCCATATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCATGAGAAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAAGTCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTGTGCTGCAGATGCCA
 ATACAGCCTCAGCAGGCCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACG
 AGCTCAACCCCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTCAACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCCCTCTCCTCGGTGTCTTGAATTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCCGGTGT
 CCCCAGAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTAGAGTGCAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCCAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTAICTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCCAGGTCACTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCGAAAGGAGTCATTGTACCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTCTGT
 GTCCAAGGTGGAGGGGGTGGCGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCACCTTAGCTGGCCCTCTGCTCTCAC
 TGCAGAACTCTTAGTGGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTTACTGAGTCACCCCAAATGCCTGATGC
 TGAAGACTTACTGCCGCCCTTTCCTGTCTCTCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCTGTCTCTTCTGGCAGGCACAGGA
 GAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCT
 TCCTCGGAGGCCCCGACCCCTCCTCCTTCTTGTTTTCAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGC
 ATGCCCTGGGCACAGTGCCCACTTCTGCCCCA

Фигура 8W

SEQ ID NO:24

Последовательность, обратнo комплементарная SEQ ID NO:10

TGCAAGAAATGTAAGTCTATTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTCAAGGGGAAAAGTCAAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAAGGCTGTCAGTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTCTTGAACATA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCTGGCTGCTGTGTCCTTTAGCAGGGCCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTCGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAACTAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCATAGCTGAGGAGTCTTTGCAATGGCCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCATATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCCCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCACTCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCAATTTCCAGAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTGTGTGCTGCAGATGCCA
 CAAAAGTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCACTGGCTGGTATCTGGTTCTCCCTGTGATTCTTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTCAGGGGGCCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTCTTTAATGTCATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTCACCACTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGTAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTGAGCCCATTTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCCTCATCATAGGCACCTTACCGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCCCTCTCCTCGGTGTCTTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
 CCCCAGAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTTGGAAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTGTTGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCCAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGTTGGGATGTAICTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTCAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTGCTCCGTATTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGAGGCTGCTTTCCTGCTCTCCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCTGTCTCTT
 CTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACTGGAATTCCTGGCAGCA
 GCAGCGGCTAGGCCCTCTCGGAGGCCCCGACCCCTCCTCCTTCTTGTTGAGCTCAGGACTGAGAGGTTGCT
 GCGTGGAGGCACTGCATGCCCTGGGCACAGTGGCCAGTTCTGCCCCA

Фигура 8X

SEQ ID NO:25

Последовательность, обратнo комплементарная SEQ ID NO:11

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTATCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTGTGGGAGAGTGAAGGCTGTCTAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTCAACATTTTGAACSTA
 TCGAAATCACTATTTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTCTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGTGTCTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTCAGGAACAGGCTCCTGCGGTGGCAC TGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTCGGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATGGCCCT
 CCTGAGCCATCAGCAGGGCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTCTGGGGCC
 TGCTGGGCC TGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAAC TGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTC TGGGGCCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCTAGGCTGGTATCTGGTTCTCTCCCTGTGATTCTCTCTTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTTACAGTCAATGCAGGCAGGGAGC
 AGCTCAACCCTTCTTTAATGTCTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGCAG
 TTATTTTGGGTGGGATTCAACACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCTCTGT
 GACCCCGGAGAGGTTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGACTTCA
 AAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCCAGAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAACATCCTCCAAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTACGCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGTGGCGGTATAGGCTGAAGGCCAAGCTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCCAGGTCAAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGAGGCTTTCTGTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTTCTG
 GCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGGCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCA
 GCGGCTAGGCCTTCTCTGGAGGCCGACCCCTCTCTCTCTTGGTTTCAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCG
 TGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGGCCAGTTCTCTGCCA

Фигура 8Y

SEQ ID NO:26

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:12

ATGTCATTTCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGCTGAGGAGTGACAGGCAGTTATTTCTGGGTGGGAT
TCACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAAC
TTGACCTCGGGGGGAATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCCTTTCTCATC
GATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGCTTCAGGGGTGCCCTCCTCCGTGATCCCCGAGAGGTCAG
CCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATACCCAGGTGGCCCAGGACTGTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGCC
AGTCTGGGTAAATGTAAGTTGGCAGACCTGCTGTTTTTCATTTTCCAGGAACTTGGTGATGATATCATGGGTGAG
TTCATTTTCCAGGTGCTGCAGTTTCCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCCAGGTATTTCA
TCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTCACAGTGGTAGATGTTAAACATGCCTAAACGCCTCATCATGGGCACC
TTCACGGTGGTCGCCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTTGGTGGCCTCAACGTCAAAGGGTCTCTCCCATT
GCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAATCCACAATT
TCCCTTGAGTTTCTTCTCCACGTAATTGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCCTCAAAGTTGACAGAG
AAGGCTTCTGAGTGGTACAGTTTTTTGACATCCTCAAAAACTTATCCACTACCTTCAGGCTCTTGTGAGGAA
CAGGCCGTTGCCCGTGGTTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTTGTGAGGGTATGGAGGAGTTCTGGAAGCCTT
CATGGACCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGACGTTGAAATTCAAGCCCTCCAGGATTTCACTGTGAGTGTGAGCC
TTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGGTGCTGTTGGA
CTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGCCGAACCTCAGCCAGGCTGGGGGTGATCTTGTGAGGGTTGGGT
GGTCTGATCATGGTGGGATGATCCGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCTCAGCCAGAGAGCCGGG
AGCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGACGCCCCATGAGACAGAAGATGGCATTGTCTTG

SEQ ID NO:27

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:13

GTTTGCAGTACACACACGAGGAGGGAGCCAGCTCAACCCCTTCTTAATGTCATTTCAGGGAGGGGGCCAGGGATG
 GAGGGGAGGGGCTGAGGAGTGACAGGCAGTTATTTCTGGGTGGGATTACCCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGA
 CTTGGTATTTTGTTCATCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGAATAGACATGGGTA
 TGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCATCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCC
 TTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCCGTGATCCCCGAGAGGTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATACC
 CAGGTGGCCAGGACTGTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGCCAGTCTGGGTAAATGTAAGTTGGCAGACC
 TGCTGTTTTCATTTTCCAGGAAC TTGGTGATGATAICATGGGTGAGTTTCAATTTCCAGGTGCTGCAGTTTCCCC
 TCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCCCAGGTATTTCAATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTC
 ACAGTGGTAGATGTTAAACATGCCTAAACGCCCTCATCATGGGCACCTTCACGGTGGTCGCCTGGTCCACGTGGA
 AGTCTCTTCTCTGGTGGCCTCAACGTCAAAGGGTCTCTCCCATTTCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGA
 GCAAAAACTGTGTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTTTCCTTCTCCACGTAATT
 GTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCTCAAAGTTGACAGAGAAGGCTTCTGAGTGGTACAGTTTTTTGA
 CATCCTCCAAAACTTATCCACTACCTTCAGGCTCTTGTGAGGAACAGGCCGTTGCCGGTGGTCAGCTGGAGC
 TGGCTGTCTGGCTTGTGAGGGTATGGAGGAGTTCCCTGGAAGCCTTCATGGACCTGAGCCTCCGGAATCTCCGT
 GACGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTTCACTGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGG
 CTGTAGCGATGCTCACTGGGAGAGAAGAATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTG
 AAGCCGAACCTCAGCCAGGCTGGGGGTGATCTTGTGAGGGTTGGGTGGTCTGATCATGGTGGGATGTATCCGT
 CTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCTCAGCCAGAGAGCCGGGAGCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGA
 GGACGCCCCATGAGACAGAAGATGGCATTGTGATTCACCGTCCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAGGCTGAGGA
 GACAGAGCCCTGTCTTGTCCGTATTTAAGCAGTGGGTGACAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATT
 AACCAAGATCACCCAGTTACCGGAGGAGCAAAACAGGGACTAAGTTTACAGGCIGGGCGCTGAGTCGCCCCCCC
 ACGCTGTCCGGACGCTCTGCCTGAGCAGCATACAGCCTCCACTGCACGTACCAAAGGAGTCATTGTACCTGGC
 TCAGAAACCACAGTGTCTGCGTCCAAGGTGGAGGGGTGGCGTGAGTCAGCCAGTCTGCTGGGAGAGTACCACT
 TTGCTGGCCCTCTGCTCTCACTGCAGAATCCTTAGCGGCTGTTCCTACTGGTAGCAAGATCTACCATTTACTAAT
 TCACCCCGAAATGCCTGATGCTGAAGACTGATGCCGCCCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGTGGCTAGGCCTTCC
 TCAGAGTGTGATCCCCCTCCTCCTCCTTTGCTCAGCTCAGTACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCACG
 CCTGGGCACAGGGCCAGTTCTTGCCACCCAGGAAGTTGGCCTCGGTTGGCGGGTGGCGGAGGCAATAGGTT
 GGGGAGGGGCGGGGAGCTTGGGCAGGAAGGGCCTTGCCCATTGCCAGGCAGACACAAGACTGGGC

SEQ ID NO:28

Последовательность, обратно комплементарная SEQ ID NO:14

GT TTG CAGT CACACACGCAGGCAGGGACCGCTCAACCCCTCTTTAATGTCATT CAGGGAGGGGGCCAGGGATG
GAGGGGAGGGGCTGAGGAGTGACAGGCAGTTATTTCTGGGTGGGATTCAACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGA
CTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGAATAGACATGGGTA
TGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTCTCATCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCC
TTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCCGTGATCCCCGAGAGGTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATACC
CAGGTGGCCAGGACTGTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGCCAGTCTGGGTAATGTAAGTTGGCAGACC
TGCTGTTTTTCATTTTCCAGGAAC TTGGTGATGATATCATGGGTGAGTT CATTTTCCAGGTGCTGCAGTTTCCCC
TCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTC
ACAGTGGTAGATGTAAACATGCCTAAACGCCTCATCATGGGCACCTTCACGGTGGTCGCCTGGTCCACGTGGA
AGTCCCTCTTCCCTTGGTGGCCTCAACGTCAAAGGGTCTCTCCCATTTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGA
GCAAAAAC TGTGTCTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTTTCTTCTCCACGTAATT
GTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCTCAAAGTTGACAGAGAAGGCTTCTGAGTGGTACAGTTT TTTGA
CATCTCCAAAAAC TTATCCACTACCTTCAGGCTCTTGTGAGGAACAGGCCGTTGCCGGTGGTCAGCTGGAGC
TGGCTGTCTGGCTTGTGAGGGTATGGAGGAGTTCCCTGGAAGCCTTCATGGACCTGAGCCTCCGGAATCTCCGT
GACGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTCAC TGTGAGTGT CAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGG
CTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTG
AAGCCGAACTCAGCCAGGCTGGGGGTGATCTTGTGAGGGTTGGGTGGTCCIGATCATGGTGGGATGTATCCGT
CTTCTGGGCAGCATCTCCTTGGGGATCCTCAGCCAGAGAGCCGGGGAGCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGA
GGACGCCCCATGAGACAGAAGATGGCATTGTCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGTGGCTAGGCCTTCTCAGAG
TGCTGATCCCTCCTCCTCTTGTCTCAGCTCAGTACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCACGCCCTGG
GCACAGGGCCCAGTTCTTGCCCAACCAGGAAGTTGGCCTCGGGTGGCGGGTGGCGGAGGCAATAGGTTGGGGAG
GGCGGGGAGCTTGGGCAGGAAGGGCCTTGCCCATTGCCAGGCAGACACAAGA

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:
202191433

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 15/113, A61K 31/712, 31/713, 31/7115, 48/00, C12N 5/22, A61P 1/16, 35/00, 43/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2012/178033 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 27.12.2012, формула, параграфы [0018], [0140]-[0141], пример 3, таблицы 3-4	1-57
A	US 2005/0137153 A1 (SIRNA THERAPEUTICS, INC.) 23.06.2005, формула, параграф [0230], фигура 5	1-57
A	WO 2009/073809 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 11.06.2009, формула, страница 6, абзацы 1-3, пример 22	1-57
A	WO 2010/148013 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 23.12.2010, формула	1-57
A	WO 2004/045543 A2 (DHARMA CON, INC.) 03.06.2004, формула	1-57
A	CRUZ Pedro E. et al. In vivo post-transcriptional gene silencing of α -1 antitrypsin by adeno-associated virus vectors expressing siRNA. Laboratory Investigation, 2007, v.87, no.9, p.893-902 doi:10.1038/labinvest.3700629, реферат, таблица 1	1-57

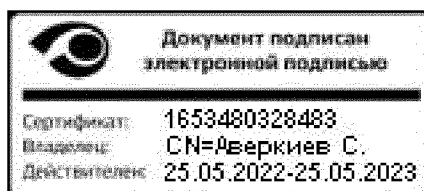
☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи
евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской
заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и
приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,
порочающий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,
порочающий изобретательский уровень в сочетании с другими докумен-
тами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 26 мая 2022 (26.05.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202191433

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2010.01)