

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042137**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.18

(21) Номер заявки
201592225

(22) Дата подачи заявки
2014.05.22

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA TMPRSS6 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/826,178; 61/912,988**

(32) **2013.05.22; 2013.12.06**

(33) **US**

(43) **2016.04.29**

(86) **PCT/US2014/039149**

(87) **WO 2014/190157 2014.11.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Батлер Джеймс, Бетгенкорт Брайан,
Раджив Каллантхоттатхил Г., Майер
Мартин, Хариссе Клаус (US)**

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

(56) **WO-A2-2012135246
WO-A1-2013070786
WO-A2-2009073809
WO-A2-2010148013
WO-A1-2010033246
WO-A1-9813526**

(57) Настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, нацеленным на ген TMPRSS6, и способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии TMPRSS6, и способам лечения субъектов с ассоциированным с TMPRSS6 расстройством, например ассоциированным с перегрузкой железом расстройством, таким как β -талассемия или гемохроматоз.

B1

042137

**042137
B1**

Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/826178, поданной 22 мая 2013 г., и предварительной заявки на патент США № 61/912988, поданной 6 декабря 2013 г. Данная заявка является родственной предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., и PCT/US2012/065601, поданной 16 ноября 2012 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок 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 21 мая 2014 г., имеет название 121301-00720_SL.txt, и ее размер составляет 449620 байт.

Уровень техники

Ген TMPRSS6 (трансмембранной протеазы, серин 6) кодирует TMPRSS6, также известную как матриптаза-2, серин-протеаза II типа. Она преимущественно экспрессируется в печени, хотя высокие уровни mRNA TMPRSS6 также обнаружены в почке, при этом в матке выявляют более низкие уровни и намного меньшие количества во многих других тканях (Ramsay et al., Haematologica (2009), 94(6), 840-849). TMPRSS6 принимает участие в гомеостазе железа путем связывания и протеолитического расщепления активатора гепсидина и ко-рецептора BMP, HJV (гемоувелина), что приводит к пониженной регуляции уровней гепсидина.

TMPRSS6 состоит из короткого N-концевого внутрицитоплазматического хвоста, трансмембранного домена II типа, "стволового" участка, состоящего из двух внеклеточных доменов CUB (фактор комплемента C1s/C1r, эмбриональный фактор роста морских ежей и BMP (костный морфогенетический белок)), трех доменов LDLR (рецептор липопротеинов низкой плотности класса A), и C-концевого домена трипсин-подобной серин-протеазы. Во внеклеточном домене также присутствуют консенсусный сайт для N-гликозилирования, и в участке, представляющем собой внутрицитоплазматический хвост, присутствует возможный сайт для фосфорилирования.

Многочисленные расстройства могут быть связаны с перегрузкой железом, состоянием, характеризующимся повышенными уровнями железа. Перегрузка железом может вызывать избыточное отложение железа в различных тканях и может приводить к поражению тканей и органов. Соответственно, в настоящее время существует потребность в способах эффективного лечения расстройств, ассоциированных с перегрузкой железом.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к композициям, содержащим средства для RNAi, например средства на основе двухнитевой iRNA, нацеленные на TMPRSS6. Настоящее изобретение также относится к способам с применением композиций по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии TMPRSS6 и для лечения ассоциированных с TMPRSS6 расстройств, например ассоциированных с перегрузкой железом расстройств, таких как талассемия, например β -талассемия, или гемохроматоз.

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке, 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 или SEQ ID NO: 5, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, 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 все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами.

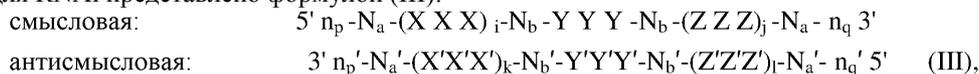
Согласно одному варианту осуществления смысловая нить и антисмысловая нить содержат участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокси-тиминового (dT) нуклеотида, 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидифицированного 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, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или имитатор 5'-фосфата (см., например, PCT публикацию № WO 2011/005860), и концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым про-

изводным 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 TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей TMPRSS6, 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 неодинаково модифицированных нуклеотида;

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

каждый из 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.

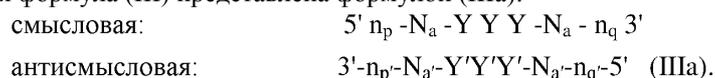
Согласно одному варианту осуществления i равняется 0; j равняется 0; k равняется 1; l равняется 1; как i , так и j равняется 0; или как i , так и j равняется 1. Согласно другому варианту осуществления k равняется 0; l равняется 0; k равняется 1; l равняется 1; как k , так и l равняются 0; или как k ,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

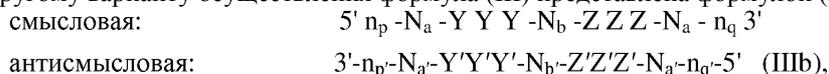
Согласно одному варианту осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

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):

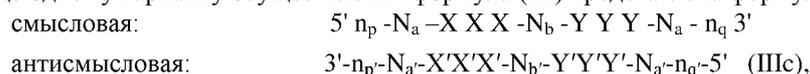


Согласно другому варианту осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):



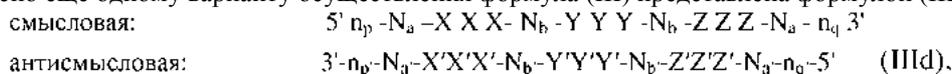
где каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

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 (IIIId):



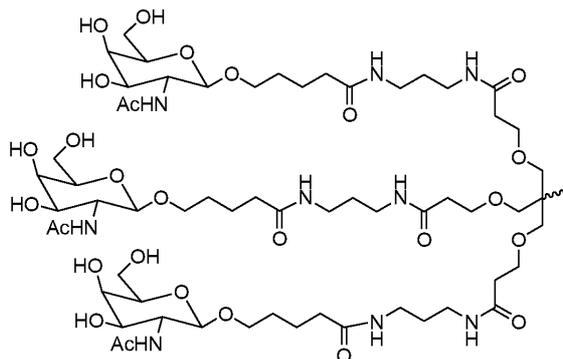
где каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, и каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 15-30 пар нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 17-23 пар 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 пар нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления двухнитевой участок составляет в длину 21-23 пар нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

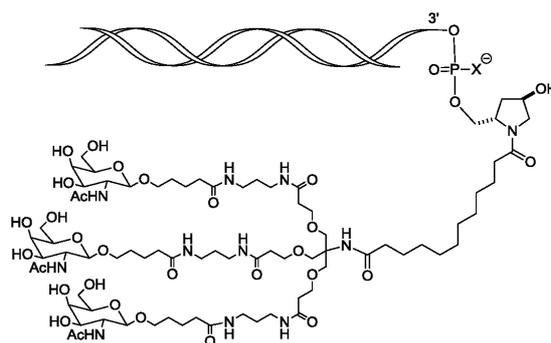
Согласно одному варианту осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-O-алкила, 2'-O-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила и их комбинаций. Согласно другому варианту осуществления модификациями нуклеотидов являются 2'-O-метил- 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 прикреплен к 3'-концу смысловой нити.

Согласно одному варианту 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 фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту осуществления фосфоротиоатная 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 фосфоротиоатная 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 фосфоротиоатная 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 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

Согласно одному варианту осуществления пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой нити дуплекса является парой оснований AU.

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

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

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

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

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить составляет в общем 21 нуклеотид, а антисмысловая нить составляет в общем 23 нуклеотида.

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

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

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, приведенных в любой из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12.

Согласно одному варианту осуществления средством для RNAi является AD-59743. Согласно другому варианту осуществления средством для RNAi является AD-60940.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухнитевым средствам для RNAi для ингибирования экспрессии Tmprss6 в клетке,

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 или SEQ ID NO: 5, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10,

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 межнауклеотидные 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 межнауклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнауклеотидные 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 все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию Tmprss6 (матриптазы-2) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей Tmprss6, где каждая нить составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' p_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая: $3' p_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III),

где каждый из 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 неодинаково модифицированных нуклеотида;

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

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

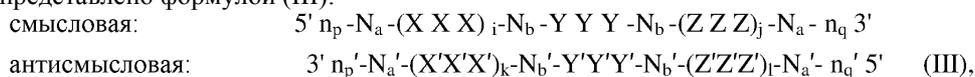
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов,

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 еще другом аспекте изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей TMPRSS6, 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 через фосфоротиоатную связь;

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

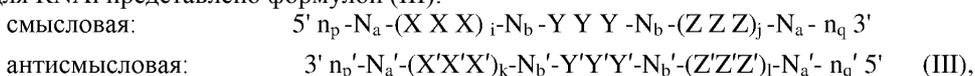
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый 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 дополнительном аспекте изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей TMPRSS6, 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 через фосфоротиоатную связь;

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

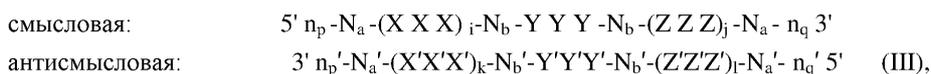
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый 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 TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей TMPRSS6, 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 через фосфоротиоатную связь;

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

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

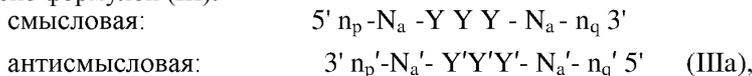
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификациями являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

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 еще другом аспекте изобретение относится к средствам для RNAi, например, двухнитевым средствам для RNAi, способным ингибировать экспрессию TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей TMPRSS6, 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 через фосфоротиоатную связь;

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

каждый 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 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.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству для RNAi, выбранному из группы средств для RNAi, приведенных в любой из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 19 и 12.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям, содержащим средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида, где средство способно ингибировать экспрессию TMPRSS6 в клетке и содержит последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12, где полинуклеотид составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов.

Изобретение также относится к клеткам, векторам, клеткам-хозяевам и фармацевтическим композициям, содержащим, например, двухнитевые средства для RNAi согласно изобретению.

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

Согласно предпочтительным вариантам осуществления средство для RNAi вводят в растворе. Согласно некоторым таким вариантам 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 вари-

антам осуществления буферным раствором является забуференный фосфатом соевым раствором (PBS).

Согласно одному варианту осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат липидный состав. Согласно одному варианту осуществления липидный состав включает LNP или ХТС. Согласно другому варианту осуществления липидный состав включает МСЗ.

В одном аспекте изобретение относится к способам ингибирования экспрессии TMPRSS6 в клетке. Способы предусматривают приведение в контакт клетки со средством для RNAi, например, с двухнитевым средством для RNAi, или средством на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида согласно настоящему изобретению, или вектором согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению; и поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления mRNA-транскрипта гена TMPRSS6, ингибируя, таким образом, экспрессию гена TMPRSS6 в клетке.

Согласно одному варианту осуществления клетка находится в субъекте.

Согласно одному варианту осуществления субъект является человеком.

Согласно одному варианту осуществления экспрессию TMPRSS6 ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100%.

Согласно другому варианту осуществления экспрессию гена гепсидина повышают по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, приблизительно в 2 раза, приблизительно в 3 раза, приблизительно в 4 раза или приблизительно в 5 раз.

Согласно еще другому варианту осуществления концентрацию гепсидина в сыворотке повышают по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 25%, приблизительно на 50%, приблизительно на 100%, приблизительно на 150%, приблизительно на 200%, приблизительно на 250% или приблизительно на 300%.

Согласно одному варианту осуществления концентрацию железа в сыворотке снижают по меньшей мере приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 98% или приблизительно на 100%.

Согласно другому варианту осуществления коэффициент насыщения трансферрина снижают по меньшей мере приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 98% или приблизительно на 100%.

В другом аспекте изобретение относится к способам лечения субъекта с расстройством, опосредованным, или ассоциированным с, экспрессией TMPRSS6. Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухнитевого средства для RNAi, согласно изобретению, или средства на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида согласно изобретению, или вектора согласно изобретению, или фармацевтической композиции согласно изобретению с лечением тем самым субъекта.

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения субъекта с TMPRSS6-ассоциированным расстройством. 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 или SEQ ID NO: 5, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10,

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,

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 все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

Согласно одному варианту осуществления субъектом является человек.

Согласно одному варианту осуществления субъект имеет расстройство, ассоциированное с перегрузкой железом, например наследственный гемохроматоз, β -талассемию (например, большую β -

талассемию и промежуточную β -талассемию), эритропоэтическую порфирию, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или атаксию Фридрейха.

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 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 8 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 9 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 12 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 13 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 14 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 16 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 18 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. Согласно определенным вариантам осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг или приблизительно 3,0 мг/кг.

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

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. Согласно конкретному варианту осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза приблизительно каждые 12 ч, одного раза приблизительно каждые 24 ч, одного раза приблизительно каждые 48 ч, одного раза приблизительно каждые 72 ч, одного раза приблизительно каждые 96 ч, одного раза приблизительно каждые 7 дней или одного раза приблизительно каждые 14 дней. Согласно определенным вариантам осуществления средство для RNAi вводят один раз в неделю в течение периода длительностью до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 5 недель или дольше.

В еще другом аспекте изобретение относится к способам лечения у субъекта ассоциированного с перегрузкой железом расстройства. Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например, двухнитевого средства для RNAi, или вектора согласно настоящему изобретению с лечением тем самым субъекта.

Согласно одному варианту осуществления ассоциированным с перегрузкой железом расстройством является гемохроматоз. Согласно дополнительному варианту осуществления ассоциированным с перегрузкой железом расстройством является талассемия, например, β -талассемия (например, большая β -талассемия и промежуточная β -талассемия), или эритропоэтическая порфирия. Согласно другому дополнительному варианту осуществления ассоциированным с перегрузкой железом расстройством является неврологическое заболевание, например, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или атаксия Фридрейха.

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, 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.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. Согласно конкретному варианту осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза приблизительно каждые 12 ч, одного раза приблизительно каждые 24 ч, одного раза приблизительно каждые 48 ч, одного раза приблизительно каждые 72 ч, одного раза приблизительно каждые 96 ч, одного раза приблизительно каждые 7 дней или одного раза приблизительно каждые 14 дней.

Согласно одному варианту осуществления введение приводит к снижению у субъекта уровней железа, уровня ферритина и/или уровня насыщения трансферрина.

Согласно одному варианту осуществления способы дополнительно включают определение уровня железа у субъекта.

Согласно одному варианту осуществления способы согласно изобретению, которые предусматривают введение средства на основе iRNA согласно изобретению (или фармацевтической композиции согласно изобретению) субъекту, практикуют совместно с введением дополнительных фармацевтических препаратов и/или другими терапевтическими способами. Согласно одному варианту осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают введение субъекту хелатора железа, например деферипрона, дефероксамина и деферазирока.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий относительные уровни mRNA TMPRSS6 в печени мышей дикого типа после введения разовой дозы в 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг средства на основе iRNA, AD-59743.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий относительные уровни mRNA гепсидина в печени мышей дикого типа после введения разовой дозы в 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг средства на основе iRNA, AD-59743.

На фиг. 3A-3E показаны уровни mRNA TMPRSS6 в печени (фиг. 3A), mRNA гепсидина (фиг. 3B), гепсидина в сыворотке (фиг. 3C), общего железа в сыворотке (фиг. 3D) и коэффициент насыщения трансферрина (фиг. 3E) у мышей C57BL/6 при различных моментах времени после разовой подкожной инъекции AD-60940 в дозе в 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг или 3,0 мг/кг или только PBS (контроль). Каждый замер представляет собой среднее значение от трех мышей. Среднее квадратичное отклонение среднего представлено "усами". На фиг. 3F показана относительная концентрация mRNA TMPRSS6 в печени в зависимости от дозы AD-60940 на 11 день после введения. Каждый замер представляет собой максимальное подавление концентрации mRNA TMPRSS6, наблюдаемое при каждом уровне дозы. Данные согласовывали с уравнением Хилла.

Фиг. 4A представляет собой схематическое изображение режима введения одной дозы в неделю в течение трех недель с последующим умерщвлением мышей на 21 день. Фиг. 4B представляет собой график, показывающий уровни mRNA TMPRSS6 в печени, mRNA гепсидина в печени и коэффициент насыщения трансферрина у мышей C57BL/6, которым вводили подкожную инъекцию AD-60940 в дозе 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг или PBS (контроль) согласно режиму, показанному на фиг. 4A. Каждый столбец представляет собой среднее значение от трех мышей. Среднее квадратичное отклонение среднего представлено "усами". На фиг. 4C показана относительная концентрация mRNA TMPRSS6 в печени в зависимости от дозы AD-60940. Данные согласовывали с уравнением Хилла.

Фиг. 5A-5D представляют собой графики, показывающие закономерность между концентрацией гепсидина в сыворотке и относительными уровнями mRNA TMPRSS6 (фиг. 5A), между коэффициентом насыщения трансферрина и относительными уровнями mRNA TMPRSS6 (фиг. 5B), между концентрацией гепсидина в сыворотке и относительными уровнями mRNA гепсидина (фиг. 5C) и между коэффициентом насыщения трансферрина и концентрацией гепсидина в сыворотке (фиг. 5D).

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий относительные уровни mRNA TMPRSS6 в печени мышей C57BL/6 после введения разовой подкожной дозы в 3 мг/кг указанного средства на основе iRNA или PBS (контроль). Столбцы представляют собой среднее от трех мышей, и "усы" представляют собой среднее квадратичное отклонение среднего.

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий относительные уровни mRNA TMPRSS6 в печени мышей C57BL/6 после подкожной дозы в 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг указанного средства на основе iRNA или PBS (контроль), один раз в неделю в течение трех недель. Столбцы представляют собой среднее от трех мышей, и "усы" представляют собой среднее квадратичное отклонение среднего.

На фиг. 8 показана нуклеотидная последовательность TMPRSS6 Homo sapiens (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 9 показана нуклеотидная последовательность TMPRSS6 Mus musculus (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 10 показана нуклеотидная последовательность TMPRSS6 Rattus norvegicus (SEQ ID NO: 3).

На фиг. 11 показана нуклеотидная последовательность TMPRSS6 Macaca mulatta (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 12 показана нуклеотидная последовательность TMPRSS6 Macaca mulatta (SEQ ID NO: 5).

На фиг. 13 показана обратная комплементарная последовательность SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 6).

На фиг. 14 показана обратная комплементарная последовательность SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 7).

На фиг. 15 показана обратная комплементарная последовательность SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 8).

На фиг. 16 показана обратная комплементарная последовательность SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 9).

На фиг. 17 показана обратная комплементарная последовательность SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO: 10).

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к композициям, содержащим средства для RNAi, например средства на основе двухнитевой iRNA, нацеленные на TMPRSS6. Изобретение также относится к способам с применением композиций согласно изобретению для ингибирования экспрессии TMPRSS6 и лечения ассоциированных с TMPRSS6 расстройств, например β -талассемии или гемохроматоза.

TMPRSS6 играет важную роль в гомеостазе железа в качестве ингибитора экспрессии гена HAMP. Ген HAMP кодирует гормон печени гепсидин, который является основным регулятором гомеостаза железа. Гепсидин связывается с экспортерным белком железа ферропортином (FPN1), который преимущественно расположен на абсорбирующих энтероцитах, гепатоцитах и макрофагах. Гепсидин, связываясь с внеклеточным доменом ферропортина, вызывает интернализацию и расщепление ферропортина, снижая тем самым всасывание поступающего с пищей железа из кишечного тракта и высвобождение железа из макрофагов и гепатоцитов. Экспрессия гена HAMP может стимулироваться в ответ на железо при помощи опосредованного ко-рецептором BMP, гемоувелином (HJV), каскада передачи сигнала, зависящего

от костного морфогенетического белка (BMP)/"Sons of Mothers Against Decapentaplegic" (SMAD). Ключевая роль TMPRSS6 в регуляции HAMP состоит в ингибировании опосредованной BMP положительной регуляции HAMP. TMPRSS6 ингибирует опосредованную BMP положительную регуляцию HAMP путем расщепления ко-рецептора BMP, HJV, который необходим для опосредованной BMP положительной регуляции HAMP; предупреждая, таким образом, передачу сигнала BMP, перемещение SMAD в ядро и транскрипционную активность HAMP.

Несколько исследований на людях и мышах подтвердили роль TMPRSS6 в регуляции HAMP и гомеостазе железа (Du et al., *Science* 2008, Vol. 320, pp1088-1092; Folgueras et al., *Blood* 2008, Vol. 112, pp2539-45). Исследования показали, что мутация потери функции в TMPRSS6 может приводить к положительной регуляции экспрессии гепсидина, приводя к наследственной железодефицитной анемии, называемой железорезистентной железодефицитной анемией (III. IIIA) (Finberg. *Seminars in Hematology* 2009, Vol. 46, pp378-86), которая характеризуется повышенными уровнями гепсидина, микроцитарной гипохромной анемии, низкому среднему клеточному объему (MCV), низкому насыщению трансферрина, слабым всасыванию железа, получаемого перорально, и недостаточному ответу на железо, получаемое парентерально. Однако, как было показано, мутации потери функции у положительных регуляторов HAMP (например, BMP1, BMP4 и HFE) отрицательно регулируют экспрессию гепсидина и приводят к вызванным перегрузкой железом расстройствам (Milet et al., *Am J Hum Gen* 2007, Vol. 81, pp799-807; Finberg et al., *Blood* 2011, Vol. 117, pp4590-9). При первоначальных расстройствах, вызванных перегрузкой железом, в совокупности называемых наследственным гемохроматозом (НН), при видах анемии, характеризующихся массовым неэффективным гематопозом, и при перегрузке железом (вторичный гемохроматоз), такой как промежуточная β -талассемия (ТТ), уровни гепсидина являются низкими, несмотря на повышенные концентрации железа в сыворотке и резервах железа. Мышиная модель промежуточной β -талассемии показала, что отсутствие экспрессии TMPRSS6 приводит к повышенным уровням гепсидина (Finberg 2010, устное выступление: "TMPRSS6, an inhibitor of Hepatic BMP/Smad Signaling, is required for Hepsidin Suppression and Iron Loading in a Mouse Model of P-Thalassemia." American Society of Hematology Annual Meeting 2010, реферат №: 164).

В изобретении описаны средства на основе iRNA, композиции и способы модулирования экспрессии гена TMPRSS6. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессию TMPRSS6 ослабляют или ингибируют с использованием средств на основе iRNA, специфических по отношению к TMPRSS6, что приводит тем самым к повышению экспрессии HAMP и сниженным уровням железа в сыворотке. Таким образом, ингибирование экспрессии или активности гена TMPRSS6 с использованием композиций на основе iRNA, предусмотренных изобретением, может быть целесообразным подходом к видам терапии, направленным на снижение уровней железа у субъекта. Такое ингибирование может быть целесообразным при лечении ассоциированных с перегрузкой железом расстройств, таких как гемохроматоз или талассемия, например β -талассемия (например, большая β -талассемия и промежуточная β -талассемия).

I. Определения.

Для того чтобы изобретение можно было более легко понять, вначале даны определения соответствующим выражениям. 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 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.

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

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

Используемое в данном документе выражение "TMPRSS6" означает ген серин-протеазы плазматической мембраны II типа (TTSP) или соответствующий белок. TMPRSS6 также известен как матриптаза-2, белок IRIDA (железорезистентная железодефицитная анемия), трансмембранная протеаза, серин 6, трансмембранная серин-протеаза 6 II типа и мембраносвязанная мозаичная сериновая протеиназа, матриптаза-2.

TMPRSS6 является трансмембранным белком серин-протеазой II типа из примерно 899 аминокислот в длину. TMPRSS6 содержит множество доменов, например, короткий эндо-домен, трансмембранный домен, домен, включающий белок спермы морских ежей/домен энтеропептидазы/агрин (SEA), два домена, включающие фактор комплемента/эмбриональный фактор роста морских ежей/BMP (CUB), три домена LDL-R A класса (LDLa) и домен трипсин-подобной серин-протеазы с консервативной триадой His-Asp-Ser (HDS). Выражение "TMPRSS6" включает TMPRSS6 человека, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GL56682967; TMPRSS6 мыши, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GL125656151; TMPRSS6 крысы, аминокис-

лотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI: 194474097; TMPRSS6 макака-резуса, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа XM_001085203.2 (GL297260989) и XM_001085319.1 (GI: 109094061). Дополнительные примеры последовательностей mRNA AGT легкодоступны при помощи общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt, OMIM, и веб-сайта проекта "Геном Масаса".

Термин "TMPRSS6", используемый в данном документе, также означает встречающиеся в природе вариации последовательности ДНК гена TMPRSS6, такие как единичный нуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене TMPRSS6. Примерные SNP можно найти в базе данных dbSNP, доступной на www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.

Используемая в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной в процессе транскрипции гена TMPRSS6, в том числе к mRNA, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

Используемое в данном документе выражение "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 изобретения.

Выражения "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 этот термин определен в данном 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 TMPRSS6 в клетке, например, клетке субъекта, как, например, субъекта-млекопитающего.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi согласно изобретению включает одноклеточную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью mRNA TMPRSS6, с направлением расщепления целевой РНК. Не желая привязываться к теории, считают, 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 одноклеточной РНК (siRNA), образованной внутри клетки, и которая способствует образованию RISC-комплекса с осуществлением сайленсинга целевого гена, т. е. гена TMPRSS6. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, которая описана выше.

Согласно другому варианту осуществления средство для RNAi может быть одноклеточной siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой mRNA. Одноклеточные средства для RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью, из RISC, который затем расщепляет целевую mRNA. Одноклеточные siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Строение и испытание одноклеточных 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 одноклеточной siRNA, кото-

рая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al. (2012) Cell 150:883-894.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретение относится к молекулам одонитевого антисмыслового олигонуклеотида, нацеливающимся на TMPRSS6. "Молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида" является комплементарной последовательности в целевой mRNA (т. е. TMPRSS6). Молекулы одонитевого 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 одонитевого антисмыслового олигонуклеотида ингибируют целевую mRNA путем гибридизации с мишенью и расщепления мишени посредством явления расщепления с помощью RNaseH. Молекула одонитевого 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 данном документе, например, последовательностей, представленных в любой из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12 или связывающихся с любым из целевых участков, описанных в данном 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 изобретению является двухнитевой РНК, и в данном 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 TMPRSS6. В некоторых вариантах осуществления согласно настоящему изобретению двухнитевая РНК (dsRNA) запускает расщепление целевой РНК, например, mRNA, через посттранскрипционный 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 изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, с целевой последовательностью mRNA TMPRSS6, направляя расщепление целевой РНК. Не желая привязываться к теории, 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 TMPRSS6 человека). Используемый в данном документе термин "участок, комплементарный части mRNA, кодирующей транстиретин" означает участок антисмысловой нити, который, по сути, комплементарен части последовательности mRNA TMPRSS6. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, тогда ошибочные спаривания наиболее допустимы в концевых участках и, если присутствуют, как правило, встречаются в концевом участке или участках, например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца и/или 3'-конца.

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.

Используемый 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 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 ч с последующим отмыванием. Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, которые могут встречаться в организме. Например, комплементарная последовательность является удовлетворительной для обеспечения выполнения соответствующей функции нуклеиновой кислоты, например, RNAL 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 выступов, то такие выступы 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 антисмысловую нить dsRNA или между антисмысловую нить 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 TMPRSS6) в том числе 5'-UTR, открытой рамке считывания (ORF) или 3'-UTR. Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA TMPRSS6, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части mRNA, кодирующей TMPRSS6.

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

Фраза "ингибирование экспрессии TMPRSS6", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена TMPRSS6 (такого как, например, ген TMPRSS6 мыши, ген TMPRSS6 крысы, ген TMPRSS6 обезьяны или ген TMPRSS6 человека), а также вариантов (например, встречающихся в природе вариантов) или мутантов гена TMPRSS6. Таким образом, ген TMPRSS6 может быть геном TMPRSS6 дикого типа, мутантным геном TMPRSS6 или трансгенным геном TMPRSS6 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена TMPRSS6" предусматривает любой уровень ингибирования гена TMPRSS6, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена TMPRSS6, 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 TMPRSS6 можно оценивать, исходя из уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена TMPRSS6, например, уровня mRNA TMPRSS6, уровня белка TMPRSS6, уровня mRNA гепсидина, уровня белка гепсидина или уровней железа в тканях или сыворотке. 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 контролем 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 включает 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, кровотока 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 способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. По отношению к способам согласно настоящему изобретению клетку также можно приводить в контакт со средством для RNAi *in vitro* и в дальнейшем пересаживать субъекту.

Выражения "пациент" или "субъект", используемые в данном документе, подразумевают как включающие либо человека, либо животного, отличного от человека, предпочтительно млекопитающего, например, человека или обезьяну. Наиболее предпочтительно, субъектом или пациентом является человек.

Выражение "ассоциированное с TMPRSS6 расстройство", используемое в данном документе, предназначен включать любое расстройство, которое можно лечить или предупреждать или симптомы которого можно облегчать, при помощи ингибирования экспрессии TMPRSS6. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированные с TMPRSS6 расстройства также ассоциированы с перегрузкой железом, состоянием, характеризующимся повышенными уровнями железа или дисрегуляцией обмена железа. Перегрузка железом может быть вызвана, например, наследственными состояниями, повышенным накоплением железа из пищи или избыточным железом, вводимым парентерально, что включает в себя внутривенную инъекцию избыточного железа, и перегрузкой железом в результате трансфузионной терапии.

Ассоциированные с TMPRSS6 расстройства включают без ограничения наследственный гемохроматоз, идиопатический гемохроматоз, первичный гемохроматоз, вторичный гемохроматоз, тяжелый ювенильный гемохроматоз, неонатальный гемохроматоз, сидеробластную анемию, гемолитическую анемию, дизэритропоэтическую анемию, серповидноклеточную анемию, гемоглобинопатию, талассемию (например, β -талассемию и α -талассемию), хронические заболевания печени, позднюю кожную порфирию, эритропоэтическую порфирию, атрансферринемия, наследственную тирозинемия, церебροгепатorenальный синдром, идиопатический гемосидероз легких, гемосидероз почек.

Ассоциированные с TMPRSS6 расстройства включают расстройства, ассоциированные с пероральным введением избытка железа, перегрузкой железом в результате трансфузионной терапии и внутривенной инъекцией избыточного железа.

Ассоциированные с TMPRSS6 расстройства также включают расстройства с симптомами, которые ассоциированы с перегрузкой железом или могут быть вызваны ею. Такие симптомы включают повышенный риск развития заболевания печени (цирроз, рак), сердечный приступ или сердечную недостаточность, сахарный диабет, остеоартрит, остеопороз, метаболический синдром, гипотиреоз, гипогонадизм и, в некоторых случаях, преждевременную смерть. Согласно одному варианту осуществления ассоциированные с TMPRSS6 расстройства включают нейродегенеративные расстройства, ассоциированные с перегрузкой железом и/или дисрегуляцией обмена железа, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, атаксия Фридрейха, эпилепсия и рассеянный склероз. Введение iRNA, которая целенаправленно воздействует на TMPRSS6, например, iRNA, описанная в любой одной из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12, может лечить один или несколько из этих симптомов или предупреждать развитие или прогрессирование заболевания или расстройства, которое отягощено повышенными уровнями железа.

Согласно одному варианту осуществления ассоциированным с TMPRSS6 расстройством является β -талассемия. β -талассемия представляет собой любое из группы наследственных расстройств, характеризующихся генетически обусловленным недостатком в синтезе бета-глобиновых цепей. При гомозиготном состоянии бета-талассемия ("большая талассемия") приводит к тяжелой, зависимой от трансфузий анемии. При гетерозиготном состоянии малая бета-талассемия ("малая талассемия") приводит к от легкой до умеренной микроцитарной анемии.

"Промежуточная талассемия" представляет собой β -талассемию, которая имеет место у субъекта, у которого клиническая тяжесть заболевания находится где-то между умеренными симптомами малой β -талассемии и большой β -талассемии. Диагноз является клиническим диагнозом, который основывается на способности пациента поддерживать удовлетворительный уровень гемоглобина (Hb) по меньшей мере в 6-7 г/дл на момент постановки диагноза без необходимости в постоянных переливаниях крови.

Согласно одному варианту осуществления β -талассемия представляет собой большую талассемию. Согласно другому варианту осуществления β -талассемия представляет собой промежуточную талассемию.

"Терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении пациенту для лечения ассоциированного с TMPRSS6 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 TMPRSS6, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы TMPRSS6-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 субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, 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 изобретению.

В данном документе описаны улучшенные двухнитевые средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена TMPRSS6 в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, как, например, человек с ассоциированным с TMPRSS6 расстройством, например, β -талассемией (например, большой β -талассемией и промежуточной β -талассемией) или гемохроматозом, и применения таких двухнитевых средств для RNAi.

Соответственно, настоящее изобретение относится к двухнитевым средствам для RNAi с химическими модификациями, способным ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена TMPRSS6) *in vivo*. В некоторых аспектах настоящего изобретения практически все нуклеотиды iRNA в соответствии с настоящим изобретением являются модифицированными. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды в iRNA в соответствии с настоящим изобретением являются модифицированными. iRNA в соответствии с настоящим изобретением, 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 в длину 14-30 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. 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 iRNA 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 лю-

бые их комбинации. Например, ТТ может быть выступающей последовательностью для любого конца на любой нити. Выступающий конец может осуществлять ошибочное спаривание с целевой iRNA 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 фосфоротиоатом 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, односторонней 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. (Eds.), 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 (лишенных азотистого основания нуклеотидов) 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 аминокислотные фосфотриэфиры, метил- и другой алкил-фосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминокислотные фосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, сложные тиоалкилфосфотриэфиры 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 атом фосфора, включают в себя скелеты, которые образуются 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; метиленаформацетильные и тио-

формацетильные 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 CH_2 .

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, аминоксилглициновым скелетом. Нуклеотидные основания сохраняются и соединяются непосредственно или опосредованно с атомом 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 в соответствии с настоящим изобретением, 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, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [известный как метилен (метилямино) или MMI скелет], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [где нативный скелет сложного фосфодиэфира представлен как $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] 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 C_1 - C_{10} алкилом или C_2 - C_{10} алкенилом и алкинилом. Типичные приемлемые модификации включают в себя $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10. Согласно другим вариантам осуществления dsRNA включают в 2'-положении одно из следующих: низший C_1 - C_{10} -алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоклиламино, полиалкиламино, замещенный силлил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и другие заместители с подобными свойствами. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-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 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, 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 - аде-

нин (А) и гуанин (G), и пиримидиновые основания - тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают в себя другие синтетические и натуральные нуклеотидные основания, такие как дезокси-тимин (dT), 5-метилцитозин (5-те-С), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропилиурацил 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-дезааденин, а также 3-деазагуанин и 3-дезааденин. 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 English et al., *Ange-wandte 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-пропилиурацил и 5-пропилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозинового 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-ННAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННAc), тимидин-2'-О-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 в соответствии с настоящим изобретением

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi в соответствии с настоящим изобретением 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'-О-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'-О-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'-О-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'-О-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 фосфориотатные 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 фосфориотатные 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'-О-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'-О-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 расщепле-

ния 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. Термин "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 O 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 одноститевом 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 модифицированы, 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'-дезоксид-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификации фосфатной группы, например, модификации фосфоротиоата. 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'-дезоксид, 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. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Термин "чередующийся нуклеотид" может означать один через каждые два нуклеотида, или один через каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой

"АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...",
 "ААВААВААВААВ...", "АААВВВВВВВВВ..." или
 "АВСАВСАВСАВС..." и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одним и тем же или разным. Например, если каждый из А, В, С, 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, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВВВВВВ..." или "СДСДСД..." и т. д.

Согласно одному варианту осуществления средство для RNAi согласно 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_aY₁Y₂N_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 "Y₁Y₂", который 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 фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной 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 фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфоротиоатной 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 концевых 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 находится 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. 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 подобной). 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.

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 анти-

смысловой нити является парой оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексном участке от 5' -конца антисмысловой нити является парой оснований AU.

Согласно одному варианту осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (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 неодинаково 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

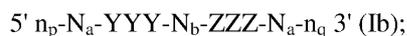
каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

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.

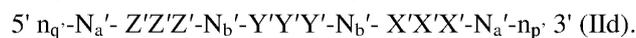
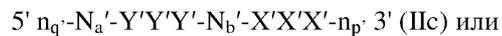
Согласно одному варианту осуществления N_a' и/или N_b' имеет модификации чередующегося паттерна.

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'-ОМемодифицированы.

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

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



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 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 (IId), 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 l 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.

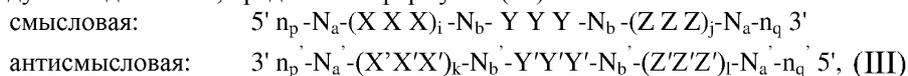
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо может быть модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.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

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY , находящийся в 9, 10 и 11 положениях нити, в тех случаях, когда 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'-ОМемодификацию или 2'-F-модификацию.

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

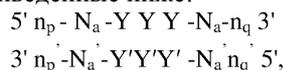
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов; где

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

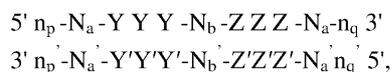
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

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.

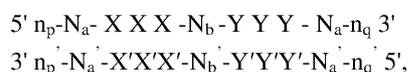
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



(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 (IIIId) может быть таким же, как остальные, или отличным от них.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), 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

ми нуклеотидами Y'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb) или (IIIc), 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 (IIIe), 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 (IIIe), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. Согласно другому варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIe), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и n_p' > 0, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. Согласно еще другому варианту осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIe), 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 фосфоротиоатной 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 (IIIe), 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 фосфоротиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную 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 фосфоротиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную 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 (IIIe), 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 (IIIe), 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 (IIIe), 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, представляющей 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 остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и

(ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения".

Выражение "точка присоединения к остову", используемое в данном документе, означает функциональную группу, например, гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную для введения носителя в остов и которая подходит для этого, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серосодержащий остов рибонуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (ТАР) 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, пирозолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой серинол, или остова, 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 табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12. Согласно одному варианту осуществления, если средство представляет собой средство, приведенное в табл. 12, то у средства может отсутствовать концевой dT.

Настоящее изобретение дополнительно включает двухнитевые средства для RNAi, содержащие любую из последовательностей, приведенных в любой из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12, которые содержат 5'-фосфат или миметик фосфата в антисмысловой нити (см., например, публикация PCT № WO 2011005860). Дополнительно настоящее изобретение включает двухнитевые средства для RNAi, содержащие любую из последовательностей, приведенных в одной из табл. 1, 2, 4, 5, 8, 10 и 12, которые включают 2'-фтор-группу вместо 2'-ОМе-группы на 5'-конце смысловой нити.

Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

Согласно одному варианту осуществления средством является AD-60940 (смысловая нить):

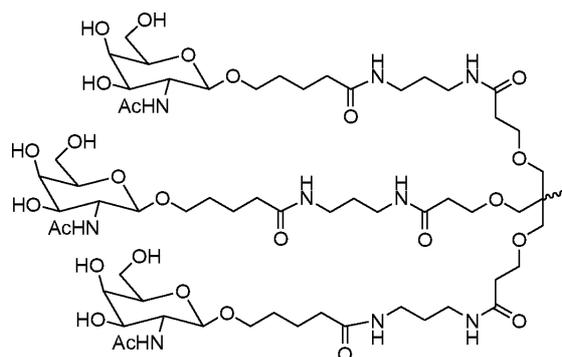
CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96;

антисмысловая нить:

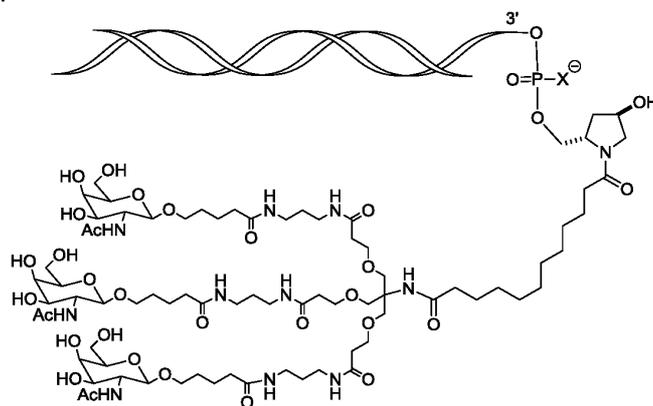
usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg).

A. Лиганды.

Средства, представляющие собой двухнитевую РНК (dsRNA), согласно 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. Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления лиганд представляет собой GalNAc₃:



Согласно некоторым вариантам 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. Согласно предпочтительным вариантам 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 нацеливающими лигандами.

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 (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленмин, 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, полиаспартат, 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, геранилосигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, 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 расстройств, 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 примерно 5-50 аминокислот в длину, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tug, 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: 11). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 12)), 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, как было обнаружено, последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ) (SEQ ID NO: 13) и белка Antennapedia Drosophila (RQKIWFQNRMMKWKK) (SEQ ID NO: 14) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фagosого дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (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 примерно 5 аминокислот до примерно 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 опухоль.

левая 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 $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Можно использовать пептиды, которые нацелены на маркеры, которыми обогащены пролиферирующие 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 пролиферирации 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 Secorin 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, CPF, 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 интегрина рецептора, лиганды для хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCP II, 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, ортоэферы, полимеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами, дендримеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами.

PK-модулятор означает фармакокинетический модулятор. PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, ви-

тамины 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 фосфоротиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных 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. Согласно предпочтительному варианту 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 азиды 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.

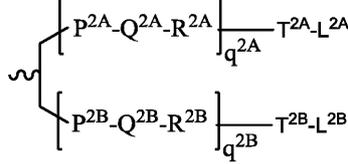
Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеосообразованиями, фрагментами, представляющими собой сахара, или межнуклеозидными связями молекул нуклеиновых кислот. Конъюгация с пуриновыми нуклеосообразованиями или их производными может происходить в любом положении, в том числе внутрикольцевых и внекольцевых атомов. Согласно некоторым вариантам осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеосообразования присоединены к фрагменту конъюгата. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеосообразованиями 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, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, 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, монсахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид,

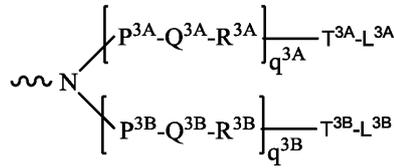
тетрасахарид, полисахарид.

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.

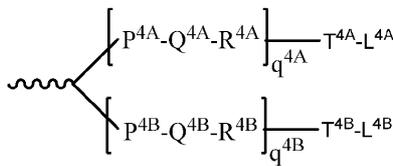
Согласно одному варианту осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные любой из формул (IV) - (VII):



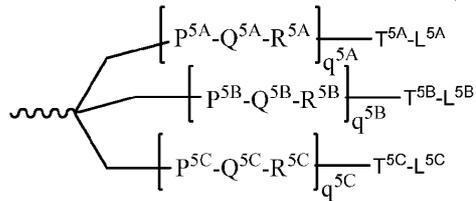
Формула (IV)



Формула (V)



Формула (VI)

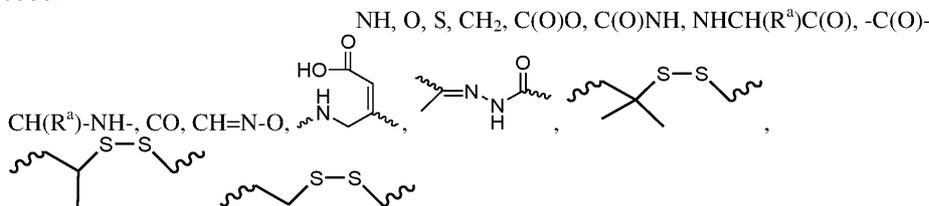


Формула (VII)

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^{5A} , T^{5B} , T^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, переставляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

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), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C=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

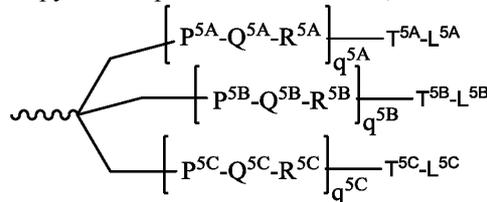


или гетероцикл;

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

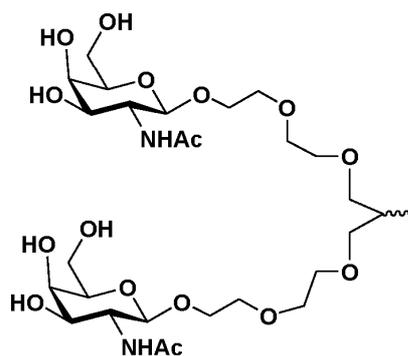
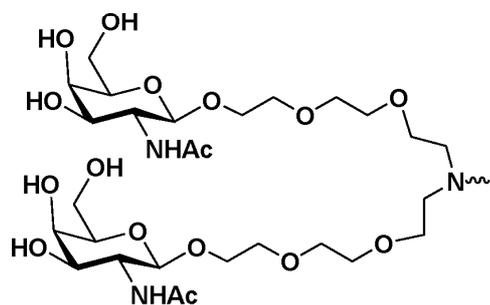
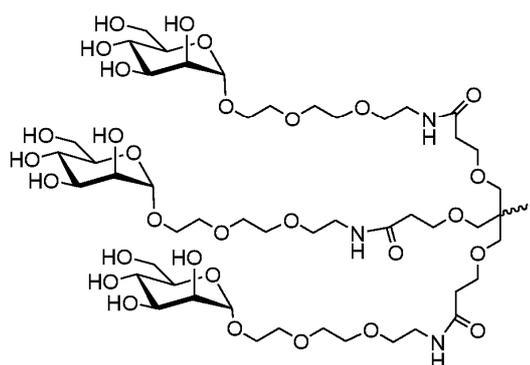
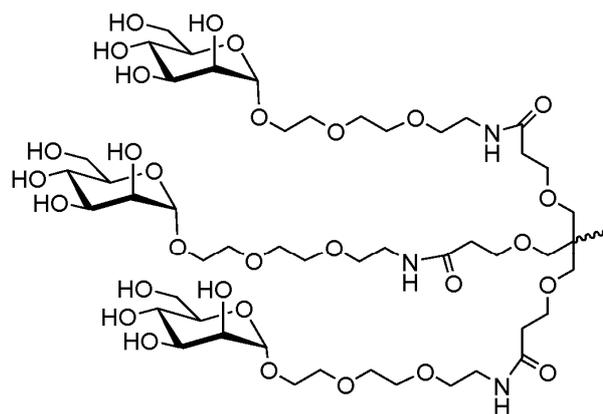
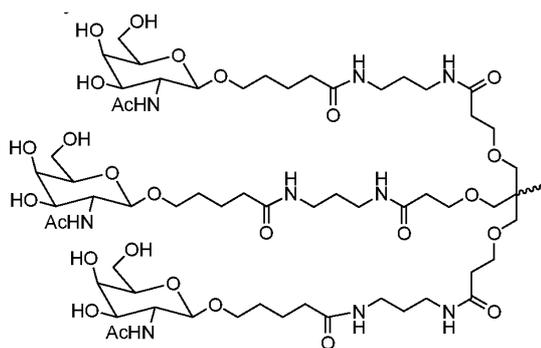
R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

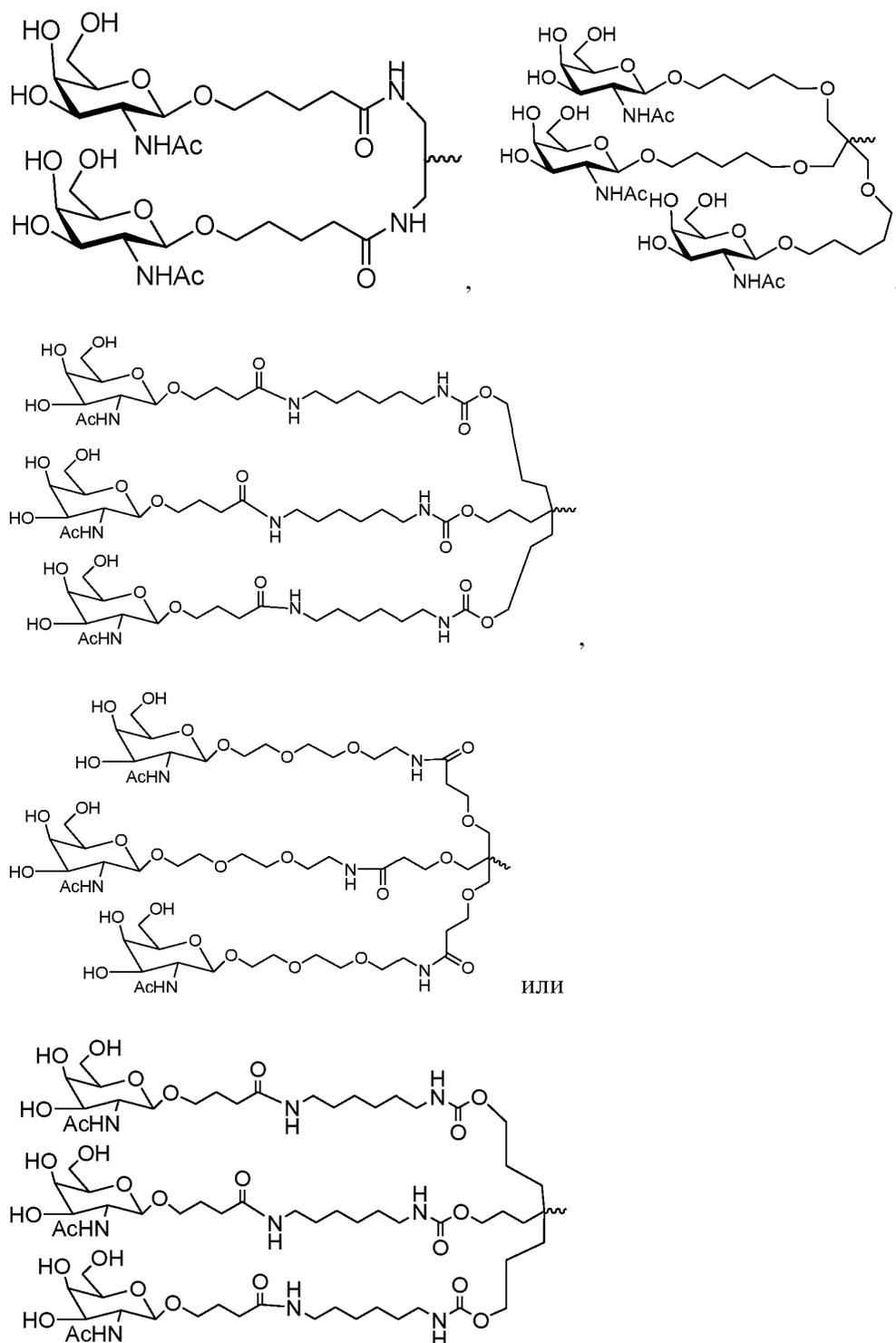
Для применения со средством для RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена особенно пригодны трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc, такие как производные формулы (VII):



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:





Согласно другим вариантам осуществления средством для RNAi для применения в способах согласно изобретению является AD-59743.

III. Доставка iRNA согласно изобретению

Доставку средства на основе iRNA согласно изобретению к клетке, например, клетке в субъекте, таком как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с ассоциированным с TMPRSS6 расстройством, таким как гемохроматоз) 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 изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL.

(1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, 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, ML, et al. (2004) *Retina* 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, SL, et al. (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждает образование новых сосудов в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухольная 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 aroB 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 мышиных моделях рака предстательной железы (McNamara, JO., et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Согласно альтернативному варианту осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной) и также увеличивают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры 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), олигофуктамин, "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), полиэтиленмин (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 полиамидамины (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. А. Кодированные вектором iRNA согласно настоящему изобретению iRNA, нацеливающиеся на ген TMPRSS6, могут экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skilleen, A., et al., международную PCT публикацию № WO 00/22113, Conrad, международную PCT публикацию № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6 054

299). 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 некаатионных липидов (например, Transit-ТКО™). 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 дольше. 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 да. 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-D-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена 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 Voesen et al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам 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 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 макака-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); РСТ публикации WO 94/12649 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 № 5 252 479; 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 Моккола 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.

IV. Фармацевтические композиции согласно изобретению

Изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA согласно изобретению. Согласно одному варианту осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацев-

тически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, являются применимыми для лечения ассоциированного с TMPRSS6 заболевания или расстройства, например гемохроматоза. 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 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 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 TMPRSS6. 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 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 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 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 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 приблизительно 40 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 45 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 45 мг/кг, от

зительно 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 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 изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления 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 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.

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 расстройства, 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, расстройства, ассоциированного с перегрузкой железом, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем снижения экспрессии Tmprss6. Такие модели можно использовать для проведения *in vivo* исследований iRNA, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в области техники и включают, например, мышь Th3/+ с талассемией в качестве модели β -талассемии (Douet et al., *Am. J. Pathol.* (2011), 178(2):774-83), нокаутную по HFE мышь в качестве модели наследственного гемохроматоза (Zhou et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 85:2492-2497); мышь Uros(mut248) в качестве модели врожденной эритропоэтической порфирии (Ged et al. (2006) *Genomics*, 87(1):84-92).

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 вдывания 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, диолеоил

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.

А. 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 бислоем 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 липида 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 Feigner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham, et al. M. 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 рН-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 рН-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 димристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции анионных липосом, как правило, образованы из димристоилфосфатидилглицерина, 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; Feigner, *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 (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-A в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина A 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 (A) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1}, или (B) 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. Parahadjoropoulos и соавт. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозидов 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 патентах 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 и соавт.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димристоилфосфатидилхолин, 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, Feigner, 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-карбоксиспермилглициндиолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPE") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Choi"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. и 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 (глицерилдистеарат/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 трансферосомы 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 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.

Трансферосомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью деформироваться, они являются перспективными кандидатами как средства доставки лекарственных средств. Трансферосомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферосомы 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 глицерола, сложные эфиры полиглицерола, 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, ациллактаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

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

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

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

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 на основе 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 бурчника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, эфиры полиоксипропилена 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 на основе 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 присутствуют 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 диметилловый 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.

В. Липидные частицы.

siRNA, 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, некаатионный 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 PCT 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 раскрыты, 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, соотношения липида и dsRNA) будет находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от прибли-

тельно 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 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 (DLenDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA·Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеил-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-дилинолеилокси-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)этилазанидиол)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-DOMG (молярный процент) с размером частиц $63,0 \pm 20$ нм и соотношением siRNA/липид 0,027.

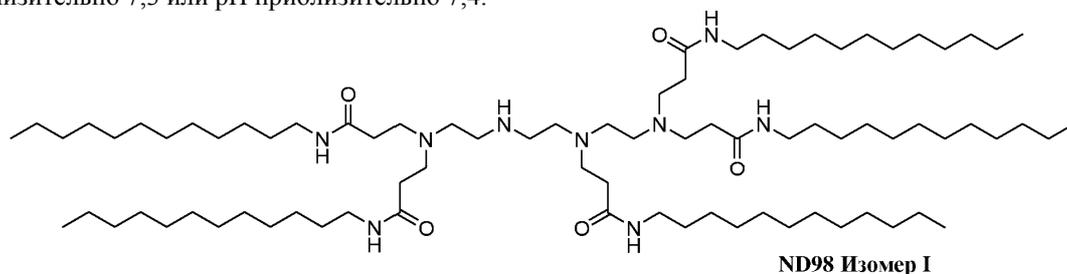
Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоил-фосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоил-фосфатидилэтаноламин-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 (C_{12}), PEG-димиристоилоксипропил (C_{14}), PEG-дипальмитилоксипропил (C_{16}) или PEG-дистеарилоксипропил (C_{18}). 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 рН приблизительно 7, например, рН приблизительно 6,9, рН приблизительно 7,0, рН приблизительно 7,1, рН приблизительно 7,2, рН приблизительно 7,3 или рН приблизительно 7,4.



Формула 1

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

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

Таблица А

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
LNP-1	1,2-дидолиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дидолинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дидолинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-дидолинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-дидолинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дидолинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дидолинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/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-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)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	XTC	XTC/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-дидиолеилокси-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.

МСЗ-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, n-пропил, n-бутил, n-пентил, n-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, пропилил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентирил, 2-пентирил, 3-метил-1-бутирил 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, валеролактаминил, 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_xSO₂R_y, -C(=O)R_x, -C(=O)OR_x, -C(=O)NR_xR_y, -SO_nR_x и -SO_nNR_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,

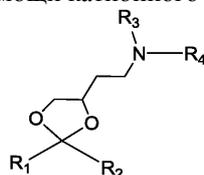
галогена, -OH, -CN, алкила, -OR_x, гетероцикла, -NR_xR_y, -NR_xC(=O)R_y, -NR_xSO₂R_y, -C(=O)R_x, -C(=O)OR_x, -C(=O)NR_xR_y, -SO_nR_x и -SO_nNR_xR_y.

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

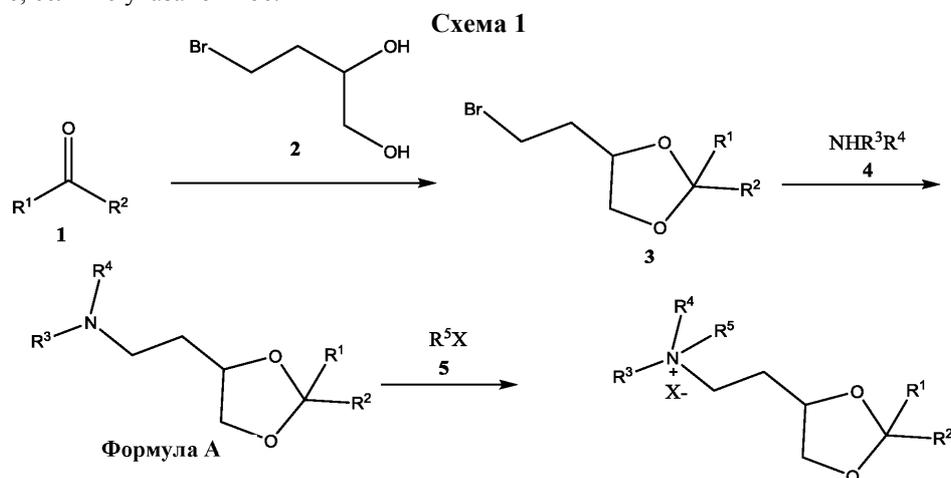
Согласно некоторым вариантам осуществления в способах согласно настоящему изобретению может потребоваться использование защитных групп. Методика с использованием защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., 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:

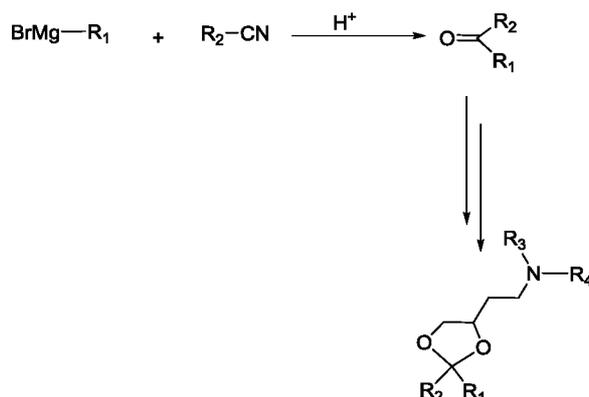


где R₁ и R₂ независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R₃ и R₄ независимо представляют собой низший алкил, или R₃ и R₄ могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. Согласно некоторым вариантам 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

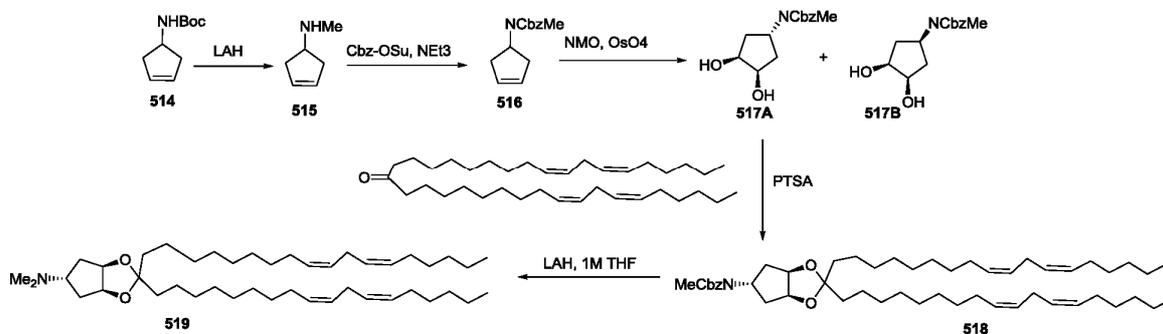


В качестве альтернативы, исходный материал, кетон 1, может быть получен согласно схеме 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы А является таким, как описано на схеме 1.

Синтез МС3.

Получение DLin-M-C3-DMA (т. е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата) было следующим. Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N,N-диметиламиномасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной хлористоводородной кислотой, за которой следовал разбавленный водный бикарбонат натрия. Органические фракции высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли при помощи роторного вакуумного испарителя. Остаток 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 LiAlH_4 (3,74 г, 0,09852 моля) в 200 мл безводного THF в двугорлой RBF (1) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моля) в 70 мл THF при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакцию 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 Na_2SO_4 . 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): $\delta = 9,34$ (широкий, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Синтез 516.

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двугорлой RBF добавляли NEt_3 (37,2 мл, 0,2669 моля) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонил)-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 однокоревой 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 М, 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 Na₂SO₄, затем фильтровали через целит и переводили в масло. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. ¹³C-ЯМР δ=130,2, 130,1 (×2), 127,9 (×3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (×2), 29,7, 29,6 (×2), 29,5 (×3), 29,3 (×2), 27,2 (×3), 25,6, 24,5, 23,3, 22,6, 14,1; электрораспыление MS (+ve): Молекулярный вес для C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺ вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

Составы, полученные либо при помощи стандартного способа, либо при помощи способа без экзотрузии, 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 веществами 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 урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую 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-додецилазациклогептан-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 полиоксипропилен-9-лауриловый эфир, полиоксипропилен-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 полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтан, 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, полидиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, р-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 внутривенного 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 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.

C. Дополнительные составы.

Эмульсии.

Композиции согласно 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 вдобавок 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 o/w включают маленькие водные капельки, составляющие эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью, или она 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 глицерилат 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 р-гидроксибензойной 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 гидроксианизол, 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 с 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 MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C₈-C₁₂) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиглицированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C₈-C₁₀глицериды, 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 (n-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рациглицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-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 b Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al., Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, выражение "соли желчных кислот" включают любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любое из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (глихолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидро-фузидат (STDHF) натрия, гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 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, двунариевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонов (енамины) (см., например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14,43-51).

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 PCT 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^d 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-ацетиамидо-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).

vi. 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 да. д., при объ-

единении 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.

vii. 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.

Согласно некоторым вариантам 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 теллапревир 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 выразить как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах клеточных культур и исследованиях на животных, можно ис-

пользовать 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 высокоэффективной 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, которые опосредованы перегрузкой железом и которые можно лечить путем ингибирования экспрессии TMPRSS6. 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.

V. Способы ингибирования экспрессии TMPRSS6

Настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии TMPRSS6 (матриптазы-2) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии TMPRSS6 в клетке, с ингибированием тем самым экспрессии TMPRSS6 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 клетки контакт 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.

Выражение "ингибирование", используемое в данном документе, используют взаимозаменяемо с "сокращением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией" и другими подобными выражениями, и оно включает любой уровень ингибирования.

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии TMPRSS6" означает ингибирование экспрессии любого гена TMPRSS6 (такого как, например, ген TMPRSS6 мыши, ген TMPRSS6 крысы, ген TMPRSS6 обезьяны или ген TMPRSS6 человека), а также вариантов или мутантов гена TMPRSS6. Таким образом, ген TMPRSS6 может быть геном TMPRSS6 дикого типа, мутантным геном TMPRSS6 или трансгенным геном TMPRSS6 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена TMPRSS6" включает любой уровень ингибирования гена TMPRSS6, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена TMPRSS6. Экспрессию гена TMPRSS6 можно оценивать, исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена TMPRSS6, например, уровня mRNA TMPRSS6, уровня белка TMPRSS6 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 TMPRSS6, 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).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена TMPRSS6 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно

75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена TMPRSS6 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 TMPRSS6 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 TMPRSS6 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:

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

В альтернативном случае, ингибирование экспрессии гена TMPRSS6 можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена TMPRSS6, например, экспрессией белка TMPRSS6, экспрессией гена или белка гепсидина или уровнями железа в тканях или сыворотке. Сайленсинг гена TMPRSS6 можно выявить в любой клетке, экспрессирующей TMPRSS6 либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области. Печень является основным местом экспрессии TMPRSS6. Другие важные места экспрессии включают почки и матку.

Доказательством ингибирования экспрессии белка TMPRSS6 может служить снижение уровня белка TMPRSS6, 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 TMPRSS6, 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 TMPRSS6, 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 TMPRSS6 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, mRNA гена TMPRSS6. 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 RAXgene (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.

Согласно одному варианту осуществления уровень экспрессии TMPRSS6 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", используемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим TMPRSS6. 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 TMPRSS6. 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. Согласно альтернативному варианту осуществления зонд(ы) иммоби-

лизируют 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 TMPRSS6.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии TMPRSS6 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 "котящегося 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 TMPRSS6 определяют при помощи флуорогенной RT-PCR (т. е. системы TaqMan™ System).

Уровни экспрессии mRNA TMPRSS6 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 TMPRSS6 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 TMPRSS6 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. Согласно дополнительным вариантам 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 TMPRSS6 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня mRNA TMPRSS6 или белка TMPRSS6 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.

VI. Способы лечения или предупреждения ассоциированного с TMPRSS6 заболевания.

Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения или предупреждения заболеваний и состояний, на которые можно воздействовать путем понижающей регуляции экспрессии гена TMPRSS6. Например, композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения любого расстройства, ассоциированного с перегрузкой железом, например, талассемии (например, β -талассемии или α -талассемии), первичного гемохроматоза, вторичного гемохроматоза, тяжелого ювенильного гемохроматоза, эритропоэтической порфирии, сидеробластной анемии, гемолитической ане-

мии, дизэритропоэтической анемии или серповидноклеточной анемии. Согласно одному варианту осуществления iRNA к TMPRSS6 применяют для лечения гемоглобинопатии. iRNA к TMPRSS6 согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения повышенных уровней железа, обусловленных другими состояниями, такими как хронический алкоголизм.

При видах талассемии костный мозг синтезирует недостаточные количества гемоглобиновых цепей, это, в свою очередь, уменьшает образование эритроцитов и приводит к анемии. Может быть поражена либо α -, либо β -цепь, но виды β -талассемии являются более распространенными. Новорожденные дети являются здоровыми, потому что их организмы еще продуцируют HbF, который не имеет β -цепей, на протяжении первых нескольких месяцев жизни костный мозг переключается на продуцирование HbA и симптомы начинают появляться.

Виды β -талассемии являются результатом мутации либо в неэкспрессирующих (β°), либо в экспрессирующих на низком уровне (β^+) аллелях гена HBB, виды β -талассемии варьируют по тяжести в зависимости от генотипа и включают малую/с наименьшей тяжестью β -талассемию (β/β° или β/β^+), промежуточную β -талассемию (β°/β^+) и большую β -талассемию (β°/β° или β°/β^+).

Промежуточная талассемия (TI), как правило, характеризуется малой степенью гемолиза, в то время как большая β -талассемия (TM), как правило, сопровождается обильным гемолизом, который приводит, например, к анемии и спленомегалии; и весьма неэффективным эритроцитопозом, который приводит к нарушениям функций костного мозга (костные изменения, остеопения), повышенному синтезу эритропоэтина, гепато-спленомегалии, потреблению тематических препаратов (мегалобластная анемия) и высокому уровню мочевой кислоты в крови. iRNA согласно настоящему изобретению, например, iRNA к TMPRSS6, лучше подходит для лечения перегрузки железом, которая, как правило, сопровождается талассемию, которая больше подобна TI (например, для лечения индивидуумов с генотипом β°/β^+ , β/β° или β/β^+).

Симптомы видов β -талассемии также включают, например, осложнения вследствие терапии, например, перегрузку железом, которая приводит к эндокринопатии, фиброзу печени и фиброзу сердца. Введение средства на основе iRNA, которая целенаправленно воздействует на TMPRSS6, может быть эффективным в лечении одного или нескольких таких симптомов.

Виды α -талассемии являются результатом мутации либо в неэкспрессирующих (α°), либо в экспрессирующих на низком уровне (α^+) аллелях генов HBA1 или HBA2, виды талассемии варьируют по тяжести в зависимости от генотипа и включают талассемию с наименьшей тяжестью ($-\alpha/\alpha$), Hb Bart и отечный синдром новорожденных ($\alpha^\circ/\alpha^\circ$), малую α -талассемию ($-/\alpha$), ($-\alpha/-\alpha$) и заболевание, ассоциированное с HbH ($-/\alpha$). Продуцируется меньшее количество α -глобиновых цепей, что приводит к избытку β -цепей у взрослых и избыточным γ -цепям у новорожденных. Избыточные β -цепи образуют нестабильные тетрамеры (называемые гемоглобин H или HbH из 4 бета-цепей), которые характеризуются аномальной кривой диссоциации кислорода. Введение средства на основе iRNA, которая целенаправленно воздействует на TMPRSS6, может быть эффективным в лечении перегрузки железом у субъекта, который имеет виды α -талассемии.

Симптомы гемохроматоза включают, например, боли в области живота, боль в суставах, усталость, упадок сил, слабость, потемнение кожи (часто называемое "бронзирование") и потерю волос на теле. Введение средства на основе iRNA, которая целенаправленно воздействует на TMPRSS6, может быть эффективным в лечении одного или нескольких таких симптомов.

Другие симптомы, ассоциированные с перегрузкой железом, включают повышенный риск развития заболевания печени (цирроз, рак), сердечный приступ или сердечную недостаточность, сахарный диабет, остеоартрит, остеопороз, метаболический синдром, гипотиреоз, гипогонадизм и, в некоторых случаях, преждевременную смерть. Неправильное распределение железа, приводящее к перегрузке, также может способствовать развитию таких нейродегенеративных заболеваний как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона с ранним началом, болезнь Хантингтона, эпилепсия и рассеянный склероз. С помощью введения средства на основе iRNA, которая целенаправленно воздействует на TMPRSS6, например, iRNA, описанной в табл. 1 или 2, можно лечить один или несколько таких симптомов или предупреждать развитие или прогрессирование заболевания или расстройства, котороеотягощено повышенными уровнями железа.

Способы согласно настоящему изобретению дополнительно относятся к применению средства на основе iRNA или фармацевтической композиции на его основе, например, для лечения расстройства, ассоциированного с перегрузкой железом, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими способами, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными терапевтическими способами, такими как, например, те, которые применяют в данный момент для лечения таких расстройств. Например, согласно определенным вариантам осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на TMPRSS6, вводят в комбинации, например, с хелаторами железа (например, десфероксамином), фолиевой кислотой, переливанием крови, кровопусканием, средствами для сдерживания развития язв, средствами для повышения уровней фетального гемоглобина (например, гидроксимочевинной), средствами для контроля инфекции (например, антибио-

тиками и противовирусными препаратами), средствами для лечения тромбического состояния или трансплантацией стволовых клеток или костного мозга. При трансплантации стволовых клеток можно использовать стволовые клетки из пуповины, как, например, от родственника, например, единокровных брата или сестры. Иллюстративные хелаторами железа включают десфероксамин, деферазирокс (Эксиджад), деферипрон, витамин Е, масло зародышей пшеницы, токоферсолан и индикаксантин.

Средство на основе iRNA и дополнительное терапевтическое средство можно вводить 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. Введение средства на основе iRNA и дополнительного терапевтического средства можно выполнять в одно и то же время или в разные моменты времени в любом порядке.

Введение средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению может снижать уровни железа, снижать уровни ферритина и/или снижать уровни насыщения трансферрина. Например, введение dsRNA может снижать уровни железа в сыворотке и/или снижать уровни ферритина в сыворотке. Уровни насыщения трансферрина могут быть снижены на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или более. Согласно варианту осуществления уровни насыщения трансферрина остаются сниженными в течение 7 дней, 10 дней, 20 дней, 30 дней или дольше после введения.

Уровни насыщения трансферрина могут быть снижены до менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или меньше. Согласно варианту осуществления сниженные уровни насыщения трансферрина сохраняются в течение 7 дней, 10 дней, 20 дней, 30 дней или дольше после введения. Насыщение трансферрина представляет собой измерение количества железа, связанного с трансферрином в сыворотке, и соответствует соотношению железа в сыворотке и общей железосвязывающей способности.

Уровни железа в сыворотке могут быть снижены на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более. Согласно другому варианту осуществления уровни железа в сыворотке остаются сниженными в течение 7 дней, 10 дней, 20 дней, 30 дней или дольше после введения.

Введение средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению предпочтительно приводит к сниженным уровням железа в крови и более предпочтительно в сыворотке или в одной или нескольких тканях млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни железа снижаются по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнями перед обработкой.

Под "снижением" в данном случае понимают статистически значимое снижение такого уровня. Снижение, например, может быть по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или более и предпочтительно до уровня, принятого как таковой в пределах диапазона нормы для индивида без такого расстройства.

Введение средства на основе iRNA согласно изобретению может повысить уровни гепсидина в сыворотке и/или повысить экспрессию гена гепсидина. Например, введение dsRNA может повысить уровень гепсидина в сыворотке по меньшей мере на приблизительно 10%, 25%, 50%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% или более. В дополнительном примере введение dsRNA может повысить уровни mRNA гепсидина по меньшей мере в приблизительно 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раза или более.

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, уровни насыщения трансферрина или ферритина в сыворотке можно отслеживать в отношении эффективности данного режима лечения.

Анализ на уровни железа, как правило, выполняют на образцах крови пациента. При помощи анализа на уровень железа измеряют количество железа в сыворотке крови, которое переносится белками-трансферринами. При помощи анализа на ТIBC (общую железосвязывающую способность) измеряют количество железа, которое будет переносить кровь, при условии, что трансферрин будет полностью насыщенным. Поскольку трансферрин продуцируется печенью, то ТIBC можно использовать для отслеживания функции печени и питания. Анализ на трансферрин представляет собой прямое измерение уровней трансферрина (также называемого сидерофилином) в крови. Уровни насыщения трансферрина можно рассчитать путем деления уровня железа в сыворотке на ТIBC. При помощи анализа на ферритин измеряют уровень белка в крови, который запасает железо для последующего использования организмом.

Обработки при помощи iRNA, описанные в данном документе, можно применять для лечения индивидов, пораженных ассоциированным с TMPRSS6 расстройством, например, с повышенными уровнями железа, как может быть видно по уровням железа в сыворотке, например, измеряемые уровни железа составляют более 350 мкг/дл, более 500 мкг/дл, более 1000 мкг/дл или более. Согласно варианту

осуществления повышенные уровни железа в сыворотке составляют, например, более 15, 20, 25 или 30 мг/г сухого веса.

Обработки при помощи iRNA, описанные в данном документе, также можно применять для лечения индивидуумов с повышенными уровнями железа, как может быть видно по повышенным уровням ферритина в сыворотке, например, измеряемые уровни ферритина составляют более 300 мкг/л, более 500 мкг/л, более 1000 мкг/л, более 1500 мкг/л, более 2000 мкг/л, более 2500 мкг/л, или 3000 мкг/л, или более.

Обработки при помощи iRNA, описанные в данном документе, дополнительно можно применять для лечения индивидуумов с повышенными уровнями железа, как может быть видно по повышенным уровням трансферрина в сыворотке, например, измеряемые уровни трансферрина составляют более 400 мг/дл, более 500 мг/л, более 1000 мг/дл или более.

Обработки при помощи iRNA, описанные в данном документе, также можно применять для лечения индивидуумов с умеренно повышенными уровнями железа, как может быть видно по умеренно повышенным уровням насыщения трансферрина, например, уровни насыщения 40%, 45%, или 50%, или более. Кроме того, обработку, описанную в данном документе, также можно применять для предупреждения повышенных уровней железа у индивидуумов только с малыми повышениями уровней насыщения трансферрина. Специалист в данной области может легко отслеживать уровни насыщения трансферрина у субъектов, получающих лечение при помощи iRNA, которое описано в данном документе, проверять на снижение уровней насыщения трансферрина по меньшей мере в 5% или 10%.

Обработки при помощи iRNA, описанные в данном документе, можно применять для лечения индивидуумов с повышенными уровнями железа, как может быть видно по значению ГВС, составляющему более 400 мкг/дл, более 500 мкг/дл, или более 1000 мкг/дл, или более.

Согласно некоторым вариантам осуществления индивидуумы, нуждающиеся в лечении при помощи средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению, характеризуются пониженными уровнями гематокрита, повышенным распределением эритроцитов по объему, повышенным количеством ретикулоцитов, пониженным количеством зрелых эритроцитов, повышенной ненасыщенной железосвязывающей способностью, пониженным неэффективным эритроцитопозом, пониженным внеклеточным гематопозом и/или пониженными уровнями экспрессии HAMP1.

Пациента дополнительно можно отслеживать при помощи анализа на уровни сахара крови (глюкозы) или уровень фетопротеина, при помощи эхокардиограммы (например, для исследования функции сердца), электрокардиограммы (ECG) (например, для просмотра электрической активности сердца), процедуры получения изображений (как, например, СТ-сканирования, MRI и ультразвукового исследования) и анализов на функцию печени. Избыточные включения железа или концентрации железа можно измерить при помощи образцов биопсии печени или с их помощью подтверждают степень поражения печени, например, стадию заболевания 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 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 лекарственного средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению или состава такого лекарственного 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.

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 оценивания тяжести заболевания.

Используемое в данном документе выражение "субъект" включает человека или отличного от человека животного, предпочтительно позвоночного и более предпочтительно млекопитающего. Субъект может включать трансгенный организм. Наиболее предпочтительно, субъектом является человек, как, например, человек, страдающий ассоциированным с TMPRSS6 заболеванием или предрасположенный к его развитию.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов согласно настоящему изобретению, экспрессия TMPRSS6 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 TMPRSS6 подавляется по меньшей мере на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% путем введения средства на основе iRNA, описанного в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления ген TMPRSS6 подавляется по меньшей мере на приблизительно 60%, 70% или 80% путем введения средства на основе iRNA. Согласно некоторым вариантам осуществления ген TMPRSS6 подавляется по меньшей мере примерно на 85%, 90% или 95% путем введения двухнитевого олигонуклеотида. Согласно другому варианту осуществления ген TMPRSS6 остается подавленным в течение 7 дней, 10 дней, 20

дней, 30 дней или дольше после введения.

Средства для RNAi согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту при помощи любого способа введения, известного в данной области, в том числе, без ограничения, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, спинномозгового и любых их комбинаций. В предпочтительных вариантах осуществления средства вводят подкожно.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. Инъекция вещества замедленного всасывания может высвобождать средство для RNAi 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 TMPRSS6, или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыроворотке. 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, внутричерепное, 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.

Способ включает введение средства на основе iRNA, например, дозы, достаточной для понижения уровней mRNA TMPRSS6 в течение по меньшей мере 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней; и необязательно введение второй разовой дозы dsRNA, 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 TMPRSS6 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. Согласно другому варианту осуществления дозы средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению вводят один раз в неделю в течение трех недель.

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 анализов, таких 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 контрольной dsRNA, такой как dsRNA, которая не нацелена на TMPRSS6.

Например, субъекту можно вводить терапевтическое количество средства на основе iRNA, как, например, 0,3 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг или 3 мг/кг dsRNA. Средство на основе iRNA можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как, например, в течение периода 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин или 25 мин. 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 TMPRSS6, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 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, как, например, дозу, приводящую к менее чем 5% инфузионной реакции, 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 нежелательного иммуностимулирующего действия, как, например, повышения уровней цитокина (например,

TNF-альфа или INF-альфа).

Многие расстройства, ассоциированные с повышенными уровнями железа, являются наследственный. Следовательно, пациенты, нуждающиеся в iRNA к TMPRSS6, могут быть выявлены при помощи сбора семейного анамнеза. Медицинский работник, такой как врач, медицинская сестра, или член семьи могут принять во внимание семейный анамнез перед назначением или введением dsRNA к TMPRSS6. Также можно выполнять ДНК-тест в отношении пациента для выявления мутации в гене TMPRSS6 перед введением пациенту dsRNA к TMPRSS6. Например, диагноз наследственный гемохроматоз может быть подтвержден путем выявления двух мутаций C282Y и H63D в гене HFE (гемохроматоз), в соответствии с номером доступа в GenBank CAB07442.1 (GI: 1890180, дата регистрации 23 октября 2008 г.).

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 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.

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, 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 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 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 приблизи-

тельно 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 предусматривает одну или несколько модификаций (например, мотивы 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 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 TMPRSS6 (который определяют, например, исходя из супрессии mRNA TMPRSS6, экспрессии белка TMPRSS6 или снижения уровней липидов) или необходимого терапевтического или профилактического эффекта, вместе с тем одновременно избегая нежелательного побочного действия.

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, интрацистернального или внутрисуставного) или емкости. В некоторых вариантах осуществления число или количество последовательных доз зависит от достижения необходимого эффекта, например, супрессии гена Tmprss6, или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, уменьшения перегрузки железом. 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 ч, приблизительно каждые 12 ч, приблизительно каждые 24 ч, приблизительно каждые 48 ч или приблизительно каждые 72 ч) с последующим более длительным периодом времени (например, приблизительно 1 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 предусматривает пять ежедневных введений средства для RNAi в течение первой недели. Согласно другому варианту осуществления фаза поддержания предусматривает введения средства для RNAi один или два раза в неделю. В дополнительном варианте осуществления фаза поддержания длится 5 недель.

Любую из этих схем необязательно можно повторять с обеспечением одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения необходимого эффекта, например, супрессии гена Tmprss6 и/или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, снижения уровней железа или уменьшения симптома талассемии, например, β -талассемии, или гематохроматоза.

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 необязательно предусматривает предоставление конечному пользователю одной или нескольких доз средства на основе iRNA и инструктирование конечного пользователя относительно введения средства на основе iRNA в режиме, описанном в данном документе, таким образом, осуществляется инструктирование конечного пользователя.

VII. 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 Tmprss6 в клетке, путем приведения клетки в контакт со средством(средствами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии Tmprss6. 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 Tmprss6 (например, средства для определения степени ингибирования mRNA Tmprss6 или белка TTR). Такие средства для определения степени ингибирования Tmprss6 могут предусматривать средства для получения образца от субъекта, 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 противоречия, 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.

Синтез кДНКс использованием набора "ABI High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813).

Мастер-микс из 2 мкл 10× буфера, 0,8 мкл 25× dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли в 10 мкл общей РНК. к ДНК 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 (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в ЕМЕМ (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), до отделения от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 96-луночной планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Впоследствии 80 мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~2×10⁴ клеток Нер3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 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 смешивали в течение 5 мин при 850 об/мин с помощью шейкера с платформой (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После того, как супернатант удаляли, лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение 5 мин. После того, как супернатант удаляли, магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и смешивали в течение 1 мин. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 75°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин и 50 мкл супернатанта, содержащего очищенную РНК, удаляли и добавляли в новый 96-луночный планшет.

PCR в режиме реального времени.

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для TMPRSS6 человека (Applied Biosystems, № по кат. Hs00542184_m1) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночный планшет (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением ΔΔCt(RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали при двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях, если не указано иное.

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением ΔΔCt способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

смысловая:

5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 15)

и антисмысловая:

5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 16).

Таблица В
Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении
последовательности нуклеиновой кислоты

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфоротиоат
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'-дезоксисуридин
s	фосфоротиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипропинол-Нур-(GalNAc-алкил)3
(Aeo)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфоротиоат
(Geo)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфоротиоат
(Teo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
(m5Ceo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
(A3m)	3'-О-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-О-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-О-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-О-метилуридин-2'-фосфат
(U3mx)	3'-О-метилксилоуридин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(pshe)	гидроксиэтилфосфоротиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат
(Tgn)	тимидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
(Cgn)	цитидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Ggn)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Agn)	аденозин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
P	5'-фосфат
(m5Cam)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
(Tam)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфоротиоат
(Aam)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфоротиоат
(Gam)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфоротиоат
Y44	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат

Пример 1. Конструирование, специфичность и прогнозирование эффективности олигонуклеотидов. Транскрипты.

Конструирование siRNA выполняли для выявления siRNA, нацеливающих на транскрипты TMPRSS6 человека, макака-резуса (*Macaca mulatta*), мыши и крысы, аннотированные в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). При конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции эталонных последовательностей bNCBI: человек - NM_153609.2; макак-резус - XM_001085203.2 и XM_001085319.1; мышь - NM_027902.2; крыса - NM_001130556.1. Вследствие высокого расхождения последовательностей примата/грызуна дуплексы siRNA конструировали в нескольких отдельных партиях, включая без ограничения партии, содержащие дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и макака-резуса; только транскриптам человека, макака-резуса и мыши; только транскриптам человека, макака-резуса, мыши и крысы и только транскриптам мыши и крысы. Все дуплексы siRNA конструировали так, чтобы они были на 100% идентичны с приведенными транскриптом человека и транскриптами других видов, рассмотренными в каждой партии конструирования (выше).

Специфичность всех возможных олигомеров из 19 нуклеотидов прогнозировали исходя из каждой последовательности. Затем отбирали кандидатные олигомеры из 19 нуклеотидов, у которых отсутствова-

ли повторения длиннее 7 нуклеотидов. Эти siRNA, 1259 кандидатных человека/макака-резуса, 91 человека/макака-резуса/мыши, 37 человека/макака-резуса/мыши/крысы и 810 мыши/крысы, использовали при обширных поисках в отношении соответствующих транскриптом (определенные как набор из записей NM_ и XM_ в пределах наборов эталонных последовательностей человека, макака-резуса, мыши или крысы в NCBI) с применением исчерпывающего алгоритма "грубой силы", включенного в скрипт питон 'BruteForce.py'. Скрипт затем разбирал выравнивания транскрипт-олигомер с получением балла, основанного на положении и количестве ошибочных спариваний между siRNA и любым потенциальным 'нецелевым' транскриптом. "Нецелевой" балл взвешивали для усиления различий в 'затравочном' участке siRNA в положениях 2-9 с 5'-конца молекулы. Каждой паре олигомер-транскрипт из поиска "грубой силы" присваивали балл для ошибочного спаривания путем суммирования отдельных баллов для ошибочного спаривания; ошибочные спаривания в положениях 2-9 определяли как 2,8, ошибочные спаривания в положениях сайта расщепления 10-11 определяли как 1,2 и ошибочные спаривания в участке 12-19 определяли как 1,0. Дополнительное нецелевое прогнозирование выполняли путем сравнения встречаемости гептамеров и октамеров, полученных из 3 отличных полученных из затравки гексамеров каждого олигомера. Гексамеры из положений 2-7 по отношению к 5'-началу использовали для создания 2 гептамеров и одного октамера. Гептамер 1 создавали путем добавления А на 3'-конец гексамера; гептамер 2 создавали путем добавления А на 5'-конец гексамера; октамер создавали путем добавления А как на 5'-конец, так и на 3'-конец гексамера. Заранее вычисляли встречаемость октамеров и гептамеров в 3'UTRome человека, макака-резуса, мыши или крысы (определенные как подпоследовательности транскриптом из базы данных эталонных последовательностей в NCBI, где конец кодирующего участка, 'CDS', является четко определенным). Встречаемость октамеров нормализовали по отношению к встречаемости гептамеров с использованием медианного значения из диапазона встречаемостей октамеров. Затем вычисляли 'miR-SeedScore' путем вычисления суммы $((3 \times \text{нормализованное подсчитанное число для октамеров}) + (2 \times \text{подсчитанное число для гептамера 2}) + (1 \times \text{подсчитанное число для гептамера 1}))$.

Обоим нитям siRNA присваивали категорию специфичности согласно рассчитанным баллам: балл выше 3 оценивали как высокоспецифичная, равный 3 как специфичная и от 2,2 до 2,8 оценивали как умеренно специфичная. siRNA упорядочивали по специфичности антисмысловой нити. Затем отбирали дуплексы из наборов вариантов человека/макака-резуса и мыши/крысы, у антисмысловых олигонуклеотидов которых отсутствовала GC в первом положении, отсутствовал G в обоих положениях 13 и 14 и присутствовали 3 или более Us или As в затравочном участке (характеристики дуплексов с высокой прогнозированной эффективностью). Подобным образом отбирали дуплексы из наборов вариантов человека/макака-резуса/мыши и человека/макака-резуса/мыши/крысы, в которых присутствовали 3 или более Us или As в затравочном участке.

Кандидатные конъюгированные с GalNAc дуплексы, 21 и 23 нуклеотида в длину для смысловой и антисмысловой нитей соответственно, конструировали путем удлинения антисмысловых олигомеров из 19 нуклеотидов 4 дополнительными нуклеотидами в 3'-направлении (сохраняя полную комплементарность с целевым транскриптом). Смысловую нить описывали как обратную комплементарную последовательность первых 21 нуклеотида антисмыслового олигомера из 23 нуклеотидов. Выбирали такие дуплексы, которые сохраняли полные соответствия ко всем выбранным транскриптам видов на протяжении всех 23 нуклеотидов.

Отбор последовательностей siRNA.

Синтезировали олигонуклеотиды siRNA из 21/23 нуклеотидов, являющиеся дуплексами человека/макака-резуса, полученными в общей сложности из 39 смысловых и 39 антисмысловых, человека/макака-резуса/мыши, полученными в общей сложности из 6 смысловых и 6 антисмысловых, человека/макака-резуса/мыши/крысы, полученными в общей сложности из 3 смысловых и 3 антисмысловых, и мыши/крысы, полученными в общей сложности из 16 смысловых и 16 антисмысловых, и составляли в конъюгированные с GalNAc дуплексы.

Последовательности смысловой и антисмысловой нитей модифицированных дуплексов показаны в табл. 1, а последовательности смысловой и антисмысловой нитей немодифицированных дуплексов показаны в табл. 2.

Таблица 1
Модифицированные последовательности TМPRSS6

ID дуплекса	ID смысловой последовательности	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
AD-58686.1	A-119159.1	UfsgsGfcCfuGfgAfgGfgGfuGfuCfuCfl96	17	A-119160.1	usUfsgAfaGfgAfcAfccuCfuCfcAfgGfcsCfsa	65
AD-58687.1	A-119175.1	GfsgsGfgUfgCfuAfcUfcUfgGfuAfuUfuCfl96	18	A-119176.1	asGfsgAfaAfuAfcCfagaGfuAfgCfaCfcsCfsc	66
AD-58688.1	A-119191.1	CfsasAfcGfgCfcUfGfGfaUfgAfgAfaAfl96	19	A-119192.1	asGfsuUfuCfuCfuCfaucCfaGfgCfcGfusUfsg	67
AD-58689.1	A-119207.1	AfsusCfGfcAfcUfUfCfuCfcCfaGfgAfuCfl96	20	A-119208.1	asAfsGfuCfuCfuUfgGfgagAfaGfuGfgCfcsAfsu	68
AD-58690.1	A-119223.1	GfsgsUfgGfcAfgGfAfgUfgGfcAfuUfl96	21	A-119224.1	asCfsaAfgAfuGfcCfaccUfcCfuGfcCfasCfsc	69
AD-58692.1	A-119161.1	GfsasCfcGfaCfuGfGfCfcAfuGfuAfuGfaCfl96	22	A-119162.1	asCfsgUfcAfuAfcAfuggCfcAfgUfcGfcsUfsc	70
AD-58693.1	A-119177.1	GfsgsUfgUfgCfGfGfUfgCfaCfuAfuGfgCfl96	23	A-119178.1	asAfsGfcAfuAfgUfgcaCfcCfGfaCfasCfsc	71
AD-58694.1	A-119193.1	GfsgsCfcUfgGfaUfGfAfgAfaAfcUfgCfl96	24	A-119194.1	asCfsgCfaGfuUfuCfucuCfaUfcCfaGfcsCfsc	72
AD-58695.1	A-119209.1	CfsusCfuGfgUfaUfUfUfcCfuAfgGfgUfaCfl96	25	A-119210.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsAfsG	73
AD-58696.1	A-119225.1	GfscsCfcCfuGfgUfcUfaAfcUfuGfgGfaUfl96	26	A-119226.1	asGfsaUfcCfcAfaGfuuaGfaCfcAfgGfcsGfsc	74
AD-58698.1	A-119163.1	GfsasGfgCfaGfaAfgUfaUfgAfuUfuGfcCfl96	27	A-119164.1	asCfsgGfcAfaAfuCfaucCfuUfcUfgCfcsUfsc	75
AD-58699.1	A-119179.1	AfsasGfcCfaGfuGfUfGfaAfaGfaCfaUfaGfl96	28	A-119180.1	asGfscUfaUfgUfcUfuucAfcAfcUfgGfcsUfsu	76
AD-58700.1	A-119195.1	GfscsCfGfgAfcCfGfAfcUfgGfcCfaUfgUfl96	29	A-119196.1	asUfsaCfaUfgGfcCfaguCfGfGfcCfcsGfsc	77
AD-58701.1	A-119211.1	CfsusCfcAfgGfuUfCfGfgGfgUfcGfaCfaCfl96	30	A-119212.1	asUfsgUfgUfcGfaCfcccGfaAfcCfuGfcsAfsG	78
AD-58702.1	A-119227.1	AfsGfcCfcUfgGfuUfcUfaCfuUfgGfgAfl96	31	A-119228.1	gsAfsuCfcCfaAfgUfuagAfcCfaGfgGfcsCfsu	79
AD-58704.1	A-119165.1	UfscsGfcCfaCfuUfCfUfcCfcAfgGfaUfcUfl96	32	A-119166.1	usAfsaGfaUfcCfuGfggaGfaAfgUfgGfcsGfsa	80
AD-58705.1	A-119181.1	AfscsUfcUfgGfuAfuUfuCfcUfaGfgGfuAfl96	33	A-119182.1	usGfsuAfcCfcUfaGfgaaAfuAfcCfaGfasGfsu	81
AD-58706.1	A-119197.1	UfscsGfcUfgAfcCfGfCfuGfgGfuGfaUfaAfl96	34	A-119198.1	usGfsuUfaUfcAfcCfcagCfGfuCfaGfcsGfsa	82
AD-58707.1	A-119213.1	GfscsCfcCfaAfcGfGfCfcUfgGfaUfgAfgAfl96	35	A-119214.1	usCfsuCfuCfaUfcCfaggCfcGfuUfgGfcsGfsc	83
AD-58708.1	A-119229.1	GfscsCfaAfgCfaGfGfGfgGfaCfaAfgUfaUfl96	36	A-119230.1	gsAfsaUfaCfuUfgUfcccCfcUfgCfuUfcsGfsc	84
AD-58710.1	A-119167.1	UfscsCfcCfuAfcAfgGfGfCfcGfaGfuAfgGfl96	37	A-119168.1	usUfscGfuAfcUfcGfgccCfuGfuAfgGfcsGfsa	85
AD-58718.1	A-119183.1	CfsusGfgGfuUfgUfUfAfcCfGfcCfuAfcAfgCfl96	38	A-119184.1	usAfsGfcGfuAfgCfgguaAfaCfaAfcCfcsAfsG	86

58711.1						
AD-58712.1	A-119199.1	CfsusGfgCfcUfgGfAFgGfgUfgUfcCfuUfl96	39	A-119200.1	usGfsaAfgGfaCfaCfcucUfcCfaGfgCfcsAfsG	87
AD-58713.1	A-119215.1	GfsusGfcGfgGfuGfCfAfcUfaUfgGfcUfuGfl96	40	A-119216.1	usAfsaAfaGfcCfaUfaguGfcAfcCfcGfcsAfsC	88
AD-58714.1	A-119231.1	UfsgsGfcAfgGfaGfGfUfgGfcAfuCfuUfgUfl96	41	A-119232.1	asGfsaCfaAfgAfuGfccaCfcUfcCfuGfcsCfsa	89
AD-58716.1	A-119169.1	CfscsCfuAfcAfgGfGfCfcGfaGfuAfcGfaAfl96	42	A-119170.1	asCfsuUfcGfuAfcUfcggCfcCfuGfuAfgsGfsg	90
AD-58717.1	A-119185.1	AfscsCfuGfcUfuCfuUfUfgGfuUfcAfuUfl96	43	A-119186.1	asGfsaAfuGfaAfcCfagaAfgAfaGfcAfgsGfsu	91
AD-58718.1	A-119201.1	UfsgsCfcUfgUfgAfuUfgGfgUfcAfaGfgAfl96	44	A-119202.1	asGfsuCfcUfuGfaCfcccAfuCfaCfaGfcsCfsa	92
AD-58719.1	A-119217.1	CfsasGfcUfuCfGfAfaAfgCfcCfcUfgGfuCfl96	45	A-119218.1	usAfsGfcCfaGfgGfgcuUfcCfaAfaGfcsUfsg	93
AD-58720.1	A-119233.1	CfscsCfcUfgGfuCfuAfaCfuUfgGfgAfuCfl96	46	A-119234.1	csAfsGafuAfcCfaAfguuAfgAfcCfaGfcsGfsg	94
AD-58721.1	A-119171.1	UfsgsCfuUfcUfuCfuUfgGfgUfuCfaUfuCfuCfl96	47	A-119172.1	usGfsgAfgAfaUfgAfaCfcAfgAfaGfaAfgsCfsa	95
AD-58722.1	A-119187.1	CfscsCfaAfcGfgCfcUfgGfaUfgAfgAfl96	48	A-119188.1	usUfsuCfuCfuCfaUfccaGfgCfcGfuUfsgGfsg	96
AD-	A-119203.1	AfsasGfgGfcCfuUfcCfAfcAfgCfuAfcUfaCfl96	49	A-119204.1	usCfsgUfaGfuAfgCfuguGfcAfgGfcCfcsUfsu	97
58723.1						
AD-58724.1	A-119219.1	GfsusCfuAfaCfuUfgGfgAfuCfuGfgGfaAfl96	50	A-119220.1	csAfsuUfcCfcAfgAfuCfaAfgUfuAfgsAfsC	98
AD-58725.1	A-119235.1	AfsgsCfuUfcGfgAfaAfgCfcCfuGfgUfcUfl96	51	A-119236.1	usUfsaGfaCfaAfgGfggcUfuCfcGfaAfgsCfsu	99
AD-58726.1	A-119173.1	CfscsAfgUfgUfgAfaAfgAfcAfuAfgCfuGfl96	52	A-119174.1	usGfscAfgCfuAfuGfucuUfuCfaCfaCfusGfsg	100
AD-58727.1	A-119189.1	CfscsAfgGfuUfcGfgGfgUfcGfaCfaUfl96	53	A-119190.1	asGfsaUfgUfgUfcGfaccCfcGfaAfcCfusGfsg	101
AD-58728.1	A-119205.1	UfscsCfaCfGcCfuGfgGfuUfgUfuAfcCfGfl96	54	A-119206.1	usAfsGcGfgGfuAfaCfaacCfcAfgCfGfGfsa	102
AD-58729.1	A-119221.1	UfsgsCfcAfaGfcAfgGfgGfgAfcAfaGfaAfl96	55	A-119222.1	asAfsuAfcUfuGfuCfcccCfuGfcUfuGfcsCfsa	103
AD-58697.1	A-119241.1	AfsusCfcAfgAfaCfaAfgAfgGfcUfgUfl96	56	A-119242.1	csCfsaCfaCfaGfcCfuccUfgUfuCfuGfcsAfsu	104
AD-58703.1	A-119243.1	UfsusCfaCfcUfcCfCfAfgAfuCfuCfcCfuCfl96	57	A-119244.1	gsUfsgAfgGfgAfgAfuCfuGfgGfaGfgUfGfsAfsa	105
AD-58709.1	A-119245.1	CfscsUfcCfGfAfgGfgUfgAfgUfgGfcCfaUfl96	58	A-119246.1	csCfsaUfgGfcCfaCfuccCfcCfuCfGfGfsGfsg	106
AD-58715.1	A-119247.1	UfscsCfaGfaAfcAfgGfgGfgCfuGfuGfl96	59	A-119248.1	gsCfscAfcAfcAfgCfcucCfuGfuUfcUfGfsGfsa	107
AD-	A-119237.1	GfsusGfuCfcUfcCfGfAfgGfgUfgAfgUfgGfl96	60	A-119238.1	gsGfscCfaCfuCfaCfuccCfGfGfaGfaAfsC	108
58730.1						
AD-58731.1	A-119249.1	UfsusCfGfgGfuCfGfAfcAfcAfuCfuGfuGfl96	61	A-119250.1	csCfscAfcAfgAfuGfuguCfGfCfcCfGfsAfsa	109
AD-58734.1	A-119251.1	UfscsGfgGfgUfcGfAfcCfaCfaUfcUfgUfgGfl96	62	A-119252.1	csCfscCfaCfaGfaUfgugUfcGfCfcCfcsGfsa	110
AD-58737.1	A-119253.1	UfsgsCfuUfcCfaGfgAfgGfaCfaGfcAfuGfl96	63	A-119254.1	gsCfscAfuGfcUfgUfcuCfcUfgGfaAfgsCfsa	111
AD-59743.1	A-120243.1	UfscsUfgGfuAfuUfUfcCfuUfaGfgGfuAfcAfl96	64	A-120244.1	usGfsuAfcCfcUfaGfgaaAfuAfcCfaGfsgsu	112

Таблица 2
Немодифицированные последовательности Tmprss6

ID дуплекса	ID смысловой последовательности	Смысловая последовательность	SEQ ID NO	Положение в NM_153609.2	Антисмысловая последовательность	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO	Положение в NM_153609.2
AD-58686.1	A-119159.1	UGGCCUGGAGAGGUCCU UC	11 3	2041-2063	A-119160.1	UUGAAGGACACCUCCAGGC CA	16 1	2041-2063
AD-58687.1	A-119175.1	GGGGUGCUACUCUGGUUU UC	11 4	319-341	A-119176.1	AGGAAAUACCAGAGUAGCACC CC	16 2	319-341
AD-58688.1	A-119191.1	CAACGGCCUGGAGAGAGA AA	11 5	1557-1579	A-119192.1	AGUUUCUCUCAUCCAGGCCGU UG	16 3	1557-1579
AD-58689.1	A-119207.1	AUCGCCACUUCUCCAGGA UC	11 6	401-423	A-119208.1	AAGAUCUCCGGGAGAAGUGGCG AU	16 4	401-423
AD-58690.1	A-119223.1	GGUGGCAGGAGGUGCAUC UU	11 7	2665-2688	A-119224.1	ACAAGAUGCCACCUCCUGCCA CC	16 5	2665-2688
AD-58692.1	A-119161.1	GACCCGACUGCCAUUGAUG AC	11 8	922-944	A-119162.1	ACGUCAUACAUGGCCAGUCGG UC	16 6	922-944
AD-58693.1	A-119177.1	GGUGUGCGGGUGCACUAUG GC	11 9	1444-1466	A-119178.1	AAGCCAUAGUGCACCCGCACA CC	16 7	1444-1466
AD-58694.1	A-119193.1	GGCCUGGAGAGAAACU GC	12 0	1561-1583	A-119194.1	ACGCAGUUUCUCUCAUCCAGG CC	16 8	1561-1583
AD-58695.1	A-119209.1	CUCUGGUUUUCCUAGGGU AC	12 1	328-350	A-119210.1	UUGUACCCUAGGAAAUACCAG AG	16 9	328-350
AD-58696.1	A-119225.1	GCCCCUGGUCUAAUCUUGG AU	12 2	2966-2989	A-119226.1	AGAUCCCAAGUAGACCAGGG GC	17 0	2966-2989
AD-58698.1	A-119163.1	GAGGCAGAAGUAUGAUUUG CC	12 3	1281-1303	A-119164.1	ACGGCAAUAUACUUCUGCC UC	17 1	1281-1303
AD-58699.1	A-119179.1	AAGCCAGUGGAAAGACAU AG	12 4	731-753	A-119180.1	AGCUAUGUCUUUCACACUGGC UU	17 2	731-753
AD-58700.1	A-119195.1	GCCGGGACCGACUGGCCAU GU	12 5	917-939	A-119196.1	AUACAUGGCCAGUCGGUCCCG GC	17 3	917-939
AD-58701.1	A-119211.1	CUCCAGGUUCGGGUCGAC AC	12 6	1894-1916	A-119212.1	AUGUGUCGACCCCGAACCUUG AG	17 4	1894-1916
AD-58702.1	A-119227.1	AGCCCCUGGUCUAAUCUUGG GA	12 7	2965-2988	A-119228.1	GAUCCCAAGUAGACCAGGGG CU	17 5	2965-2988
AD-58704.1	A-119165.1	UCGCCACUUCUCCAGGAU CU	12 8	402-424	A-119166.1	UAAGAUCUCCGGGAGAAGUGGC GA	17 6	402-424
AD-58705.1	A-119181.1	ACUCUGGUUUUCCUAGGG UA	12 9	327-349	A-119182.1	UGUACCCUAGGAAAUACCAGA GU	17 7	327-349
AD-58706.1	A-119197.1	UCGCGUACCGCUGGUGAU AA	13 0	1934-1956	A-119198.1	UGUUUAUACCCAGCGGUCAGC GA	17 8	1934-1956
AD-58707.1	A-119213.1	GCCCCAACGGCCUGGAUGA GA	13 1	1553-1575	A-119214.1	UCUCUCAUCCAGGCCGUUGGG GC	17 9	1553-1575
AD-58708.1	A-119229.1	GCCAAGCAGGGGACAAGU AU	13 2	2610-2633	A-119230.1	GAAUACUUGUCCCCUGCUUG GC	18 0	2610-2633
AD-58710.1	A-119167.1	UCCCCUACAGGGCCGAGUA CG	13 3	680-702	A-119168.1	UUCGUACUCGGCCUGUAGGG GA	18 1	680-702
AD-58711.1	A-119183.1	CUGGGUUGUUACCGCUACA GC	13 4	769-791	A-119184.1	UAGCUGUAGCGGUACAACCC AG	18 2	769-791
AD-58712.1	A-119199.1	CUGGCCUGGAGAGGUGUCC UGAAGGACACCUCCAGGCC	13 18	2040-2062	A-119200.1	UGAAGGACACCUCCAGGCC	18 18	2040-2062

58712.1		UU	5			AG	3	
AD- 58713.1	A-119215.1	GUGCGGGUGCACUAUGGCU UG	13 6	1447-1469	A-119216.1	UACAAGCCAUAUGUGCACCCGC AC	18 4	1447-1469
AD- 58714.1	A-119231.1	UGGCAGGAGGUGGCAUCUU GU	13 7	2667-2690	A-119232.1	AGACAAGAUGCCACCUCCUGC CA	18 5	2667-2690
AD- 58716.1	A-119169.1	CCCUACAGGGCCGAGUACG AA	13 8	682-704	A-119170.1	ACUUCGUACUCGGCCUUGUAG GG	18 6	682-704
AD- 58717.1	A-119185.1	ACCUGCUUCUUCUGGUUCA UU	13 9	559-581	A-119186.1	AGAAUGAACCCAGAAGAAGCAG GU	18 7	559-581
AD- 58718.1	A-119201.1	UGCCUGUGAUGGGGUAAG GA	14 0	1530-1552	A-119202.1	AGUCCUUGACCCCAUCACAGG CA	18 8	1530-1552
AD- 58719.1	A-119217.1	CAGCUUCGGAAGCCCGG UC	14 1	2955-2978	A-119218.1	UAGACCAGGGGUUCGGAAGC UG	18 9	2955-2978
AD- 58720.1	A-119233.1	CCCCUGGUCUAACUUGGA UC	14 2	2967-2990	A-119234.1	CAGAUCCCAAGUUGACCAGG GG	19 0	2967-2990
AD- 58721.1	A-119171.1	UGCUUCUUCUGGUUCAUUC UC	14 3	562-584	A-119172.1	UGGAGAAUGAACCCAGAAGAAG CA	19 1	562-584
AD- 58722.1	A-119187.1	CCCAACGGCCUGGAGUGAGA GA	14 4	1555-1577	A-119188.1	UUUCUCUCAUCCAGGCCGUUG GG	19 2	1555-1577
AD- 58723.1	A-119203.1	AAGGGCCUGCACAGCUACU AC	14 5	1054-1076	A-119204.1	UCGUAGUAGCUGGUCAGGCC UU	19 3	1054-1076
AD- 58724.1	A-119219.1	GUCUAAUUGGGAUCUGGG AA	14 6	2973-2996	A-119220.1	CAUUCCCAGAUCCCAAGUUG AC	19 4	2973-2996
AD- 58725.1	A-119235.1	AGCUUCGGAAGCCCGG CU	14 7	2956-2979	A-119236.1	UUAGACCAGGGGUUCGGAAG CU	19 5	2956-2979
AD- 58726.1	A-119173.1	CCAGUGUGAAAGCAUAGC UG	14 8	734-756	A-119174.1	UGCAGUAUGUUCUACACACU GG	19 6	734-756
AD- 58727.1	A-119189.1	CCAGUUCGGGGUCGACAC AU	14 9	1896-1918	A-119190.1	AGAUGUGUCGACCCGAACCU GG	19 7	1896-1918
AD- 58728.1	A-119205.1	UCCACGGGGUUGUUAAC GC	15 0	763-785	A-119206.1	UAGCGGUAACAACCCAGCGUG GA	19 8	763-785
AD- 58729.1	A-119221.1	UGCCAAGCAGGGGACAAG UA	15 1	2609-2632	A-119222.1	AAUACUUGUCCCGUCUUGG CA	19 9	2609-2632
AD- 58697.1	A-119241.1	AUCCAGAACAGGAGGCUGU GU	15 2	1324-1346	A-119242.1	CCACACAGCCUCCUUGUUGG AU	20 0	1324-1346
AD- 58703.1	A-119243.1	UUCACCUCCAGAUCCCC UC	15 3	1414-1436	A-119244.1	GUGAGGGAGAUUGGGAGGUG AA	20 1	1414-1436
AD- 58709.1	A-119245.1	CCUCCGAGGGUGAGUGGCC AU	15 4	1862-1884	A-119246.1	CCAUGGCCACUACCCUCGGA GG	20 2	1862-1884
AD- 59743.1	A-120243.1	UCCAGAACAGGAGGUGUG CA	15 0	1325-1347	A-119248.1	GCCACACAGCCUCCUUGUCUG GU	20 8	1325-1347
AD- 58730.1	A-119237.1	GUGUCCUCCAGGGUGAGU GG	15 6	1858-1880	A-119238.1	GGCCACUACCCUCCGAGGAC AC	20 4	1858-1880
AD- 58731.1	A-119249.1	UUCGGGGUCGACACAUUCG UG	15 7	1901-1923	A-119250.1	CCCACAGAUUGUGCGACCCG AA	20 5	1901-1923
AD- 58734.1	A-119251.1	UCGGGGUCGACACAUUCGU GG	15 8	1902-1924	A-119252.1	CCCCACAGAUUGUCGACCCC GA	20 6	1902-1924
AD- 58737.1	A-119253.1	UGCUCCAGGAGGACAGCA UG	15 9	1966-1988	A-119254.1	GCCAUGCUGUCCUCCUGGAAG CA	20 7	1966-1988

Пример 2. In vitro тест разовой дозы.

Модифицированные и конъюгированные дуплексы siRNA к TMPRSS6 также оценивали на эффективность с помощью анализов с трансфекцией на клеточной линии Hep3B человека. siRNA к TMPRSS6 трансфицировали в двух дозах, 10 нМ и 0,1 нМ. Результаты этих анализов показаны в табл. 3, и данные выражены как доля оставшегося количества транскрипта в клетках, трансфицированных siRNA, нацеливающимися на TMPRSS6, по отношению к клеткам, трансфицированным отрицательным по siRNA контролем, AD-1955, \pm среднее квадратичное отклонение (SD).

Таблица 3
Тест разовой дозы TMPRSS6

ID дуплекса	Средн. 10 нМ	SD 10 нМ	Средн. 0,1 нМ	SD 0,1 нМ
AD-58686.1	71,58	18,94	103,29	32,00
AD-58687.1	89,33	13,14	104,94	20,06
AD-58688.1	34,16	11,36	87,18	8,43
AD-58689.1	79,82	7,28	110,37	6,08
AD-58690.1	69,10	9,83	99,92	24,84
AD-58692.1	79,21	5,67	136,49	0,84
AD-58693.1	77,29	12,12	106,01	17,97
AD-58694.1	50,51	10,36	89,47	3,84
AD-58695.1	54,37	5,75	87,66	13,59
AD-58696.1	93,26	0,06	84,79	3,84
AD-58697.1	72,95	23,41	98,98	10,29
AD-58698.1	42,61	7,81	109,98	16,78
AD-58699.1	24,93	8,58	79,71	12,55
AD-58700.1	74,10	15,37	89,75	7,80
AD-58701.1	79,18	8,18	89,70	9,98
AD-58702.1	96,43	18,38	113,05	10,65
AD-58703.1	79,15	28,50	97,30	6,79
AD-58704.1	67,92	0,87	92,26	1,24
AD-58705.1	59,50	20,47	99,25	3,28
AD-58706.1	71,67	0,75	102,38	14,88
AD-58707.1	77,89	22,26	97,52	1,31
AD-58708.1	73,87	9,61	98,38	1,81
AD-58709.1	94,62	4,69	100,73	16,10
AD-58710.1	59,19	10,57	95,23	11,99
AD-58711.1	63,62	16,83	103,11	3,66
AD-58712.1	65,79	6,96	81,58	1,50
AD-58713.1	84,14	26,41	101,56	5,60
AD-58714.1	64,73	6,06	102,37	1,63

AD-58715.1	91,05	18,67	101,08	11,00
AD-58716.1	70,07	13,02	97,20	2,98
AD-58717.1	11,27	6,91	66,56	4,32
AD-58718.1	62,10	18,62	89,01	15,30
AD-58719.1	72,94	18,26	91,58	9,97
AD-58720.1	60,51	14,43	90,92	5,68
AD-58721.1	17,72	7,70	56,72	2,57
AD-58722.1	51,65	11,33	81,44	0,50
AD-58723.1	53,27	21,60	94,25	16,20
AD-58724.1	58,03	49,89	77,11	4,63
AD-58725.1	54,58	40,10	76,12	1,59
AD-58726.1	10,33	9,88	42,75	7,97
AD-58727.1	62,80	26,45	83,23	13,10
AD-58728.1	49,36	36,27	83,30	1,74
AD-58729.1	43,83	61,99	73,54	19,33
AD-58730.1	59,60	41,85	76,12	1,03
AD-58731.1	85,29	24,78	128,06	32,14
AD-58734.1	85,71	10,74	101,75	6,11
AD-58737.1	79,87	10,59	114,89	7,46

Пример 3. In vivo тест разовой дозы с применением AD-59743.

Способность AD-59743 подавлять экспрессию белка TMPRSS6 оценивали путем измерения уровней TMPRSS6 и mRNA гепсидина в печени мышей C57BL/6 дикого типа после введения AD-59743. Разовую дозу в 1, 3 или 10 мг/кг AD-59743 вводили подкожно и мышей умерщвляли на 3 день или 7 день. Уровни TMPRSS6 и mRNA гепсидина в печени измеряли при помощи qPCR с применением способов, описанных выше. Контрольная группа получала инъекции с PBS.

Уровни TmRNA TMPRSS6 после введения AD-59743 показаны на фиг. 1, а уровни mRNA гепсидина после введения AD-59743 показаны на фиг. 2. Из результатов видно дозозависимое снижение уровней транскриптов TMPRSS6, которое длится до 7 дней.

Пример 4. In vivo эффект средства на основе iRNA к TMPRSS6 в комбинации с хелатором железа.

Целью данного исследования было исследовать воздействие совместного введения специфичной к TMPRSS6 siRNA и хелаторов железа на уровни железа. В течение исследования мышей C57BL/6 дикого типа и мышей Th3/+ с талассемией возрастом 6 недель (Douet et al., Am. J. Pathol. (2011), 178(2):774-83) кормили пищей с низким содержанием железа, содержащей 3-5 ppm железа. Мышам вводили внутривенно состав AF-011-46273, содержащий деферипрон, хелатор железа в дозе 250 мг/кг/день и средство на основе iRNA со следующей структурой: олигопосл-смысловая - uGGuAuuuccuAGGGuAcAdTsdT (SEQ ID NO: 209); олигопосл-антисмысловая - UGuACCCuAGGAAuACcAdTsdT (SEQ ID NO: 210).

Состав также содержал MC-3/DSPC/холестерол/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5. Собирали ткани печени и селезенки и в ткани определяли концентрации негемового железа как описано ранее (см., например, Schmidt et al. (2013) Blood 121(7): 1200-8; Cook, JD, et al., Tissue iron stores. В: Cook JD, издатель. Methods in Hematology. Vol 1. New York, NY: Churchill Livingstone Press; 1980. p. 104-109).

Результаты данных экспериментов показывали аддитивный эффект AD-46273 и деферипрона у мышей Th3/+, с пониженными уровнями железа по отношению к отрицательным контролям.

Пример 5. Конструирование, специфичность и прогнозирование эффективности олигонуклеотидов.

Транскрипты.

Конструирование siRNA выполняли для выявления siRNA, нацеливающих на транскрипты TMPRSS6 человека, макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*; в дальнейшем "супо"), мыши и крысы, аннотированные в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). При конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции эталонных последовательностей в NCBI: человека - NM_153609.2; мыши - NM_027902.2; крысы - NM_001130556.1. Для супо последовательность транскрипта получали путем выравнивания с TMPRSS6 человека с последовательностью, собранной из двух образцов: "ENSP00000384964 [mRNA] локус=chr10:82446450:82485403:-" и FR874253.1, доступные от проекта "Геном *M. fascicularis*" и базы данных нуклеотидов NCBI, соответственно (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/download.jsp> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Вследствие высокого расхождения последовательностей примата/грызуна дуплексы siRNA конструировали в

нескольких отдельных партиях, включая без ограничения партии, содержащие дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и супо; только транскриптам человека, супо и мыши и только транскриптам человека, супо, мыши и крысы. Большое количество дуплексов siRNA конструировали так, чтобы они были на 100% идентичны предусмотренному участку с приведенными транскриптом человека и транскриптами других видов, рассмотренными в каждой партии конструирования (выше). В некоторых случаях ошибочные спаривания между дуплексом и целевой mRNA допускались в первом антисмысловом (последнем смысловом) положении, в тех случаях если комплементарной парой оснований антисмысловой нити щелевой mRNA была пара GC или CG. В этих случаях дуплексы конструировали с парами UA или AU в качестве первой антисмысловой:последней смысловой пары. Таким образом, дуплексы сохраняли комплементарность, но являлись несовпадающими по отношению к мишени (U:C, U:G, A:C или A:G).

Специфичность всех возможных олигомеров из 19 нуклеотидов прогнозировали исходя из каждой последовательности. Затем отбирали кандидатные олигомеры из 19 нуклеотидов, у которых отсутствовали повторения длиннее 7 нуклеотидов. Эти siRNA, 1128 кандидатных человека/супо, 69 человека/супо/мыши и 23 человека/супо/мыши/крысы использовали при обширных поисках в отношении соответствующих транскриптом (определенные как набор из записей NM_ и XM_ в пределах наборов эталонных последовательностей человека, мыши или крысы в NCBI, и набор транскриптом супо в базе нуклеотидов NCBI) с применением исчерпывающего алгоритма "грубой силы", включенного в скрипт питон 'BruteForce.py'. Скрипт затем разбирал выравнивания транскрипт-олигомер с получением балла, основанного на положении и количестве ошибочных спариваний между siRNA и любым потенциальным 'нецелевым' транскриптом. "Нецелевой" балл взвешивали для усиления различий в 'затравочном' участке siRNA в положениях 2-9 с 5'-конца молекулы. Каждой паре олигомер-транскрипт из поиска "грубой силы" присваивали балл для ошибочного спаривания путем суммирования отдельных баллов для ошибочного спаривания; ошибочные спаривания в положениях 2-9 определяли как 2,8, ошибочные спаривания в положениях сайта расщепления 10-11 определяли как 1,2 и ошибочные спаривания в участке 12-19 определяли как 1,0. Дополнительное нецелевое прогнозирование выполняли путем сравнения встречаемости гептамеров и октамеров, полученных из 3 отличных полученных из затравки гексамеров каждого олигомера. Гексамеры из положений 2-7 по отношению к 5'-началу использовали для создания 2 гептамеров и одного октамера. Гептамер 1 создавали путем добавления A на 3'-конец гексамера; гептамер 2 создавали путем добавления A на 5'-конец гексамера; октамер создавали путем добавления A как на 5'-конец, так и на 3'-конец гексамера. Заранее вычисляли встречаемость октамеров и гептамеров в 3'UTRome человека, супо, мыши или крысы (определенные как подпоследовательности транскриптом из базы данных эталонных последовательностей в NCBI, где конец кодирующего участка, 'CDS', является четко определенным). Встречаемость октамеров нормализовали по отношению к встречаемости гептамеров с использованием медианного значения из диапазона встречаемостей октамеров. Затем вычисляли 'mirSeedScore' путем вычисления суммы ((3×нормализованное подсчитанное число для октамеров)+(2×подсчитанное число для гептамера 2)+(1×подсчитанное число для гептамера 1)).

Обоим нитям siRNA присваивали категорию специфичности согласно рассчитанным баллам: балл выше 3 оценивали как высоко специфичная, равный 3 как специфичная и от 2,2 до 2,8 оценивали как умеренно специфичная. Авторы данной заявки упорядочивали по специфичности антисмысловой нити. Авторы данной заявки затем отбирали умеренно (или более высоко) специфичные дуплексы, антисмысловые олигонуклеотиды которых обладали характеристиками дуплексов с высокой прогнозированной эффективностью, включая максимальное содержание UA в затравочном участке и общее низкое содержание GC.

Для конъюгированных с GalNaC дуплексов смысловые олигонуклеотиды из 21 нуклеотида и антисмысловые олигонуклеотиды из 23 нуклеотидов конструировали путем удлинения антисмысловых олигонуклеотидов из 19 нуклеотидов (описанные выше) до 23 нуклеотидов комплементарной целевой последовательности. Все транскрипты видов, включенных в партии конструирования проверяли на комплементарность. Для каждого дуплекса смысловой олигонуклеотид из 21 нуклеотида описывали как обратную комплементарную последовательность первых 21 нуклеотида антисмысловой нити.

Отбор последовательностей siRNA.

Синтезировали олигонуклеотиды siRNA из 21/23 нуклеотидов, являющиеся дуплексами человека, полученными из 5 смысловых и 5 антисмысловых, человека/супо, полученными в общей сложности из 32 смысловых и 32 антисмысловых, человека/супо/мыши, полученными в общей сложности из 4 смысловых и 4 антисмысловых, человека/супо/мыши/крысы, полученными в общей сложности из 8 смысловых и 8 антисмысловых, человека/супо/крысы, полученными в общей сложности из 19 смысловых и 19 антисмысловых, человека/мыши, полученными в общей сложности из 2 смысловых и 2 антисмысловых, и человека/мыши/крысы, полученными в общей сложности из 1 смысловой и 1 антисмысловой, и составляли в конъюгированные с GalNaC дуплексы.

Последовательности смысловой и антисмысловой нитей немодифицированных дуплексов показаны в табл. 4, а последовательности смысловой и антисмысловой нитей модифицированных дуплексов пока-

заны в табл. 5.

Таблица 4

Немодифицированные последовательности Tmprss6

ID дуплекса	ID смысловой последовательности	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	ID антисмысловой последовательности	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Положение в NM_153609.2
AD-60944.1	A-122732.1	GGUGCUACUCUGGUAUUUCCU	211	A-122733.1	AGGAAAUACCAGAGUAGCACCCC	280	318
AD-59743.1	A-120243.1	UCUGGUUUUCCUAGGGUACA	212	A-120244.1	UGUACCCUAGGAAAUACCAGAGU	281	326
AD-60940.1	A-122745.1	CUGGUUUUCCUAGGGUACAA	213	A-122746.1	UUUGUACCCUAGGAAAUACCAGAG	282	327
AD-61002.2	A-122838.1	UGGUUUUCCUAGGGUACAAA	214	A-122839.1	UUUGUACCCUAGGAAAUACCAGA	283	328
AD-61000.1	A-122852.1	GGUUUUUCCUAGGGUACAAGA	215	A-122853.1	UCUUGUACCCUAGGAAAUACCAG	284	329
AD-46273.1	A-96908.1	UGGUUUUCCUAGGGUACA	216	A-96909.1	UGUACCCUAGGAAAUACCA	285	330
AD-61003.1	A-122854.1	GUUUUUUCCUAGGGUACAAGGA	217	A-122855.1	UCCUUGUACCCUAGGAAAUACCA	286	330
AD-60994.1	A-122848.1	AUUUCCUAGGGUACAAGGCGA	218	A-122849.1	UCGCCUUGUACCCUAGGAAAUAC	287	332
AD-60990.1	A-122830.1	UUUCCUAGGGUACAAGGCGGA	219	A-122831.1	UCCGCCUUGUACCCUAGGAAAU	288	333
AD-60956.1	A-122736.1	CGCCACUUCUCCAGGAUCUU	220	A-122737.1	AAGAUCCUGGGAGAAGUGGCGAU	289	400
AD-60981.1	A-122757.1	GCCACUUCUCCAGGAUCUUA	221	A-122758.1	UAAGAUCCUGGGAGAAGUGGCGA	290	401
AD-60953.1	A-122775.1	CUGCUUCUUCUGGUUCAUUCU	222	A-122776.1	AGAAUGAACCCAGAAGAGCAGGU	291	558
AD-60977.1	A-122783.1	CUUCUUCUGGUUCAUUCUCCA	223	A-122784.1	UGGAGAAUGAACCCAGAAGAGCA	292	561
AD-60964.1	A-119169.2	CCCUACAGGGCCGAGUACGAA	224	A-122764.1	UUCGUACUCGGCCUGUAGGGGA	293	679
AD-60947.1	A-122773.1	CUACAGGGCCGAGUACGAAGU	225	A-122774.1	ACUUCGUACUCGGCCUGUAGGG	294	681
AD-60957.1	A-122751.1	GCCAGUGUGAAAGACAUAGCU	226	A-122752.1	AGCUAUGUCUUUCACACUGGCUU	295	730
AD-60960.1	A-122792.1	AGUGUGAAAGACAUAGCUGCA	227	A-122793.1	UGCAGCUAUGUCUUUCACACUGG	296	733
AD-60972.1	A-122796.1	CACGUCGGGUUGUUACCGUA	228	A-122797.1	UAGCGUAACAACCCAGCGUGGA	297	762
AD-60970.1	A-122765.1	GGGUUGUACCGCUACAGCUA	229	A-122766.1	UAGCGUAGCGGUAACAACCCAG	298	768
AD-60963.1	A-122753.1	CGGGACCGACUGGCCAUUAU	230	A-122754.1	AUACAUGGCCAGUCGGUCCCGGC	299	916
AD-60968.1	A-122739.1	CCGACUGGCCAUUAUGACGU	231	A-122740.1	ACGUCAUCAUGGCCAGUCGGUC	300	921
AD-60942.1	A-122786.1	GGGCCUCACAGCUACUACGA	232	A-122787.1	UCGUAGUAGCUGGAGGCCUUU	301	1053
AD-60951.1	A-122749.1	GGCAGAAGUAUGAUUUGCCGU	233	A-122750.1	ACGGCAAUCAUUCUUGCCUC	302	1280
AD-60984.1	A-122800.1	CCAGAACAGGAGGCUUGUGG	234	A-122801.1	CCACACAGCCUCCUUGUUGGAU	303	1323
AD-60955.1	A-122806.1	CAGAACAGGAGGCUUGUGGC	235	A-122807.1	GCCACACAGCCUCCUUGUUGGA	304	1324
AD-60943.1	A-122802.1	CACCUCCAGAUUCCUCCAC	236	A-122803.1	GUGAGGGAGAUUCGGAGGUGAA	305	1413
AD-61001.1	A-122823.1	CACCUCCAGAUUCCUCCAA	237	A-122824.1	UUGAGGGAGAUUCGGAGGUGAA	306	1413
AD-60974.1	A-122741.1	UGUGCGGGUGCACUAGGGUU	238	A-122742.1	AAGCCUAGUGCACCCGCACACC	307	1443
AD-60982.1	A-122769.1	GCGGGUGCACUAGGGUUGUA	239	A-122770.1	UACAAGCCUAGUGCACCCGCAC	308	1446
AD-60996.1	A-122834.1	CCCCUGCCUGGAGAGUCCU	240	A-122835.1	AGGAACUCCAGGGCAGGGGUC	309	1479
AD-60997.1	A-122850.1	CCUUGCCUUGGAGAGUCCUA	241	A-122851.1	UAGGAACUCCAGGGCAGGGGU	310	1480
AD-61006.1	A-122856.1	CCUGCCUUGGAGAGUCCUUA	242	A-122857.1	AGAGGAACUCCAGGGCAGGGG	311	1481
AD-60988.1	A-122844.1	CUGCCUUGGAGAGUCCUUA	243	A-122845.1	UAGAGGAACUCCAGGGCAGGG	312	1482
AD-60959.1	A-122777.1	CCUUGUAGGGGUCAAGGACU	244	A-122778.1	AGUCCUAGCCCAUCACAGGCA	313	1529
AD-60999.1	A-122836.1	GGACUGCCCAACGGCCUGGA	245	A-122837.1	UCCAGGCCGUUGGGGAGUCCUU	314	1545
AD-60991.1	A-122846.1	ACUGCCCAACGGCCUGGAUA	246	A-122847.1	UAUCCAGGCCGUUGGGGAGUCC	315	1547
AD-60993.1	A-122832.1	CUGCCCAACGGCCUGGAUGA	247	A-122833.1	UCAUCCAGGCCGUUGGGGAGUC	316	1548
AD-61005.1	A-122840.1	UGCCCAACGGCCUGGAUGAA	248	A-122841.1	UUCAUCCAGGCCGUUGGGGAGU	317	1549
AD-60987.1	A-119213.2	GCCCAACGGCCUGGAUGAGA	249	A-122829.1	UCUCAUCCAGGCCGUUGGGGAG	318	1550
AD-60986.1	A-122842.1	CCCAACGGCCUGGAUGAGAA	250	A-122843.1	UUUCAUCCAGGCCGUUGGGGCA	319	1551
AD-60952.1	A-119187.2	CCCAACGGCCUGGAUGAGAGA	251	A-122761.1	UCUCUCAUCCAGGCCGUUGGGG	320	1552
AD-60983.1	A-119191.2	CAACGGCCUGGAUGAGAGAAA	252	A-122785.1	UUUCUCAUCCAGGCCGUUGGG	321	1554
AD-60950.1	A-122734.1	ACGGCCUGGAUGAGAGAAACU	253	A-122735.1	AGUUUCUCAUCCAGGCCGUUG	322	1556
AD-60980.1	A-122743.1	CCUGGAUGAGAGAAACUGCGU	254	A-122744.1	ACGAGUUUCUCAUCCAGGCC	323	1560
AD-60998.1	A-122821.1	CACUGGACUGUGGCCUCAA	255	A-122822.1	UUGGAGGCCACAGUCACAGUCCU	324	1804
AD-60961.1	A-122808.1	GUCCUCCGAGGGUAGUGGCC	256	A-122809.1	GGCCACUACCCUCCGAGGACAC	325	1857
AD-61004.1	A-122825.1	CUCCGAGGGUAGUGGCCAUA	257	A-122826.1	UAUGGCCACUACCCUCCGAGGA	326	1860
AD-60949.1	A-122804.1	UCCGAGGGUAGUGGCCAUGG	258	A-122805.1	CCAUGGCCACUACCCUCCGAGG	327	1861
AD-60969.1	A-119189.2	CCAGGUUCGGGGUCGACACAU	259	A-122755.1	AUGUGUCAGCCCCAACCCUGGAG	328	1893
AD-60966.1	A-122794.1	AGGUUCGGGGUCGACACAU	260	A-122795.1	AGAUGUGUCGACCCGAACCCUGG	329	1895
AD-60967.1	A-122810.1	CGGGGUCGACACAUUGUGGG	261	A-122811.1	CCCACAGAUUGUCGACCCCGAA	330	1900
AD-60989.1	A-122816.1	CGGGGUCGACACAUUGUGGA	262	A-122817.1	UCCACAGAUUGUCGACCCCGAA	331	1900
AD-60973.1	A-122812.1	GGGGUCGACACAUUGUGGGG	263	A-122813.1	CCCACAGAUUGUCGACCCCGA	332	1901
AD-60992.1	A-122818.1	GGGGUCGACACAUUGUGGGA	264	A-122819.1	UCCACAGAUUGUCGACCCCGA	333	1901
AD-60985.1	A-122827.1	GGGUCGACACAUUGUGGGGA	265	A-122828.1	UCCACAGAUUGUCGACCCCG	334	1902

AD-60977.1	A-122783.1	CfsusUfcUfuCfuGfGfUfuCfaUfuCfuCfcAfl96	389	A-122784.1	usGfsgAfgAfaUfgAfaccAfgAfaGfaAfgscsa	458
AD-60978.1	A-122798.1	CfscsAfaGfcAfgGfGfGfAfaGfuAfuUfl96	390	A-122799.1	asAfsuAfcUfuGfuCfcccCfuGfcUfuGfgscsa	459
AD-60979.1	A-122814.1	CfsusUfcCfaGfaAfgGfGfAfaGfcAfuGfCfl96	391	A-122815.1	gsCfscAfuGfcUfgUfccuCfcUfgGfaAfgscsa	460
AD-60980.1	A-122743.1	CfscsUfgGfaUfgAfgAfaAfcUfgCfGfl96	392	A-122744.1	asCfsgCfaGfuUfuCfucuCfaUfcCfaGfscsc	461
AD-60981.1	A-122757.1	GfscsCfaCfuUfcUfcCfcAfgGfaUfuUfl96	393	A-122758.1	usAfsaGfaUfcUfcGfGggaGfaAfgUfgGfscgsa	462
AD-60982.1	A-122769.1	GfscsGfgGfuGfcAfcUfaUfgGfcUfuGfuAfl96	394	A-122770.1	usAfscaAfaGfcCfaUfaguGfcAfcCfcGfscasc	463
AD-60983.1	A-119191.2	CfsasAfcGfgCfcUfgGfGfaUfgAfgAfaAfl96	395	A-122785.1	usUfsuCfuCfuCfaUfccacGfgCfcGfuUfgsgsg	464
AD-60984.1	A-122800.1	CfscsAfgAfaCfaGfGfAfgGfcUfgUfgGfl96	396	A-122801.1	csCfsaCfaCfaGfcCfuccUfgUfuCfuGfgsas	465
AD-60985.1	A-122827.1	GfsgsGfuCfGfcAfcAfcUfuGfuGfgGfAfl96	397	A-122828.1	usCfscCfcAfcAfgAfcUfuGfuGfcCfcscsg	466
AD-60986.1	A-122842.1	CfscsCfcAfaCfGfCfcUfuGfuGfaGfaAfl96	398	A-122843.1	usUfscUfcAfuCfcAfcGfcUfgUfgGfgGfscsa	467
AD-60987.1	A-119213.2	GfscsCfcCfaAfcGfGfCfcUfgGfaUfgAfgAfl96	399	A-122829.1	usCfsuCfaUfcCfaGfcGccGfuUfgGfgGfscasg	468
AD-60988.1	A-122844.1	CfsusGfcCfcUfgGfAfgGfaGfuCfuCfuAfl96	400	A-122845.1	usAfsGfgGfaAfcUfcuccCfaGfgGfcAfgsgsa	469
AD-60989.1	A-122816.1	CfsgsGfgGfuCfGfcAfcAfcUfuGfuGfgAfl96	401	A-122817.1	usCfscAfcAfcUfgUfuccGfGfcAfcCfcGfscsa	470
AD-60990.1	A-122830.1	UfsusUfcCfuAfgGfGfUfaCfaAfgGfcGfaAfl96	402	A-122831.1	usCfscCfcCfuUfgUfuccCfuAfgGfGfscsa	471
AD-60991.1	A-122846.1	AfscsUfgCfcCfcAfaCfGfCfcUfgGfaUfuAfl96	403	A-122847.1	usAfsuCfcAfgGfcGfcUfgGfgGfCfaGfscsc	472
AD-60992.1	A-122818.1	GfsgsGfgUfcGfaCfaCfaUfcUfgUfgGfAfl96	404	A-122819.1	usCfscCfaCfaGfaUfgUfgGfcCfcCfscgsa	473
AD-60993.1	A-122832.1	CfsusGfcCfcCfaAfcGfGfcUfgGfaUfgAfl96	405	A-122833.1	usCfsaUfcCfaGfcGfcUfgUfgGfcAfgsgsc	474
AD-60994.1	A-122848.1	AfsusUfcCfcUfaGfGfGfuAfaGfGfcGfaAfl96	406	A-122849.1	usCfsgCfcUfuGfuAfcuccUfaGfGfaAfusasc	475
AD-60996.1	A-122834.1	CfscsCfcUfgCfcCfuUfgGfAfgUfuCfuUfl96	407	A-122835.1	asGfsgAfaCfuCfuCfcagCfcGfaGfgGfsgsu	476
AD-60997.1	A-122850.1	CfscsCfuGfcCfcUfgGfGfaGfaUfcUfuAfl96	408	A-122851.1	usAfsGfaAfcUfcUfccacGfgGfcAfgGfsgsu	477
AD-60998.1	A-122821.1	CfsasCfuGfaCfaCfuUfgGfGfcUfcCfuAfl96	409	A-122822.1	usUfsgGfaGfgCfcAfcagUfgAfcAfgUfgGfscsu	478
AD-60999.1	A-122836.1	GfsgsAfcUfgCfcCfcAfaCfGfGfcUfuGfaAfl96	410	A-122837.1	usCfscAfgGfcCfGfUfgGfgGfGfaGfuCfscusu	479
AD-61000.1	A-122852.1	GfsgsUfaUfuUfcCfuAfgGfGfUfaCfaAfgAfl96	411	A-122853.1	usCfsuUfgUfaCfcCfuagCfaAfaUfaCfscasg	480
AD-61001.1	A-122823.1	CfsasCfcUfcCfcAfgGfaUfcUfcCfuCfaAfl96	412	A-122824.1	usUfsgAfgGfGfAfcUfcUfccacGfgGfgUfgsasa	481
AD-61002.1	A-122838.1	UfsgsGfuAfuUfcCfcUfaGfGfGfuAfcAfaAfl96	413	A-122839.1	usUfsuGfuAfcCfcUfagGfaAfuAfcCfasgsa	482
AD-61003.1	A-122854.1	GfscsUfuUfcUfcUfaGfGfGfuAfcAfaGfaAfl96	414	A-122855.1	usCfscUfuGfuAfcCfcUfaGfGfaAfuAfcscsa	483
AD-61004.1	A-122825.1	CfsusCfcGfaGfgGfUfgGfaUfgGfcCfuAfl96	415	A-122826.1	usAfsuGfgCfcAfcUfccacCfcUfgGfgAfgsgsa	484
AD-61005.1	A-122840.1	UfsgsCfcCfcAfaCfGfGfcCfuGfgAfuGfaAfl96	416	A-122841.1	usUfscAfuCfcAfgGfcgUfgUfgGfgCfasgsu	485
AD-61006.1	A-122856.1	CfscsUfgCfcCfuGfGfAfgAfgUfcUfuUfl96	417	A-122857.1	asGfsaGfgAfaCfuCfuccAfgGfcGfaGfgsgsg	486

Пример 6. In vitro тест разовой дозы.

Клеточная культура и трансфекция для исследований разовой дозы и дозозависимого эффекта.

Клетки Нер3В (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слипания при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в DMEM (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), до отделения от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 96-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин 80 мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~2×10⁴ клеток Нер3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 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 смешивали в течение 5 мин при 850 об/мин с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и смешивали в течение 1 мин. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин. Удаляли 40 мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

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 10× буфера, 0,8 мкл 25× dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли в 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.

PCR в режиме реального времени.

2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для TMPRSS6 (Applied Biosystems, № по кат. Hs00542184_ml) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку

в 50 384-луночных планшетов (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени осуществляли в системе "Roche Lightcycler Real Time PCR" (Roche) с применением $\Delta\Delta Ct(RQ)$ -анализа. Каждый дуплекс исследовали при двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях, если не указано иное в итоговых таблицах.

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением $\Delta\Delta Ct$ -способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками.

Данные выражены как доля оставшегося количества транскрипта TMPRSS6 в клетках, трансфицированных siRNA, нацеливающимися на TMPRSS6, по отношению к необработанным клеткам. Все siRNA трансфицировали по меньшей мере два раза и реакции qPCR выполняли в двух экземплярах. Данные показаны в табл. 6.

Таблица 6
Тест разовой дозы TMPRSS6

ID дуплекса	Средн. 10 нМ	Средн. 0,1нМ	SD 10 нМ	SD 0,1нМ
AD-46273	76,5	112,1	14,3	18,6
AD-59743	61,4	108,2	8,7	4,4
AD-60939	38,0	85,7	19,3	25,2
AD-60940	24,2	22,6	10,1	9,7
AD-60941	48,5	84,7	11,7	29,7
AD-60942	102,9	111,2	4,3	44,8
AD-60943	86,2	96,5	2,3	28,8
AD-60944	24,6	78,5	1,1	36,5
AD-60945	65,8	140,9	0,5	59,2
AD-60946	50,3	105,9	4,1	31,2
AD-60947	79,1	147,2	12,3	51,2
AD-60948	81,0	113,9	0,6	32,7
AD-60949	111,3	96,2	8,2	28,1
AD-60950	53,8	93,2	7,6	42,3
AD-60951	74,1	121,6	6,4	56,2
AD-60952	47,6	118,3	8,1	52,4
AD-60953	22,0	56,7	8,3	18,0
AD-60954	23,3	55,8	5,3	31,7
AD-60955	110,8	117,5	1,6	38,7
AD-60956	15,8	29,6	1,7	10,2

AD-60957	22,3	58,3	1,5	6,1
AD-60958	106,4	136,0	24,1	61,7
AD-60959	79,6	123,3	0,6	49,9
AD-60960	17,4	49,4	8,6	10,2
AD-60961	107,7	129,0	6,6	50,5
AD-60962	90,2	113,3	8,0	67,2
AD-60963	117,4	138,1	2,6	16,8
AD-60964	80,7	123,2	24,2	18,9
AD-60965	30,1	80,2	9,0	20,8
AD-60966	54,1	133,6	4,6	44,0
AD-60967	122,2	147,4	11,7	42,0
AD-60968	86,9	142,0	39,9	49,7
AD-60969	106,2	116,3	16,6	39,1
AD-60970	54,6	112,6	7,3	11,8
AD-60971	50,5	118,8	6,9	47,0
AD-60972	55,6	94,2	6,5	3,4
AD-60973	126,1	133,6	8,0	36,8
AD-60974	82,6	115,0	8,7	43,7
AD-60975	88,2	114,3	13,6	43,9
AD-60976	46,3	71,0	11,6	30,2
AD-60977	13,5	26,4	3,4	9,2
AD-60978	72,7	92,9	6,4	31,7
AD-60979	103,8	97,0	13,7	29,2
AD-60980	28,4	58,0	12,3	21,1
AD-60981	56,0	80,6	18,3	4,5
AD-60982	102,4	137,4	15,2	16,4
AD-60983	60,8	87,1	10,1	20,3
AD-60984	53,6	116,7	1,2	47,8
AD-60985	72,6	99,2	0,7	21,7
AD-60986	90,1	96,4	6,6	29,5
AD-60987	83,1	90,7	1,6	13,7
AD-60988	69,4	102,3	2,4	55,4
AD-60989	112,4	105,7	0,6	14,7
AD-60990	90,4	93,4	6,2	4,1
AD-60991	97,6	95,6	15,5	23,4
AD-60992	104,0	131,4	6,9	33,7
AD-60993	118,6	129,2	10,5	30,1
AD-60994	25,9	57,2	6,8	0,3
AD-60996	77,3	94,2	7,8	12,6
AD-60997	60,1	80,9	18,8	7,5
AD-60998	32,6	61,4	5,7	24,6
AD-60999	133,6	110,9	39,7	15,4
AD-61000	55,8	117,6	14,2	24,9
AD-61001	57,9	85,2	8,1	42,0
AD-61002	15,4	31,4	1,5	10,1
AD-61003	82,3	98,1	4,0	11,8
AD-61004	106,4	97,7	38,5	18,8
AD-61005	138,0	141,2	65,7	20,0
AD-61006	31,7	70,9	7,8	6,6

Пример 7. In vivo эффект введения разовой дозы средства на основе iRNA к TMPRSS6.

Самкам мышей C57BL/6 вводили разовую подкожную инъекцию AD-60940 в дозе 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг или 3,0 мг/кг или только PBS в качестве контроля. На дозу оценивали по три мыши в отношении mRNA TMPRSS6 в печени, mRNA гепсидина в печени, гепсидина в сыворотке, общего железа в сыворотке и коэффициента насыщения трансферрина при различных моментах времени. Мышей, получающих 1,0 мг/кг или 3,0 мг/кг AD-60940 или PBS, оценивали на 0 день (перед обработкой) и на 7, 11, 14 и 21 дни после обработки. Мышей, получающих 0,3 мг/кг AD-60940, оценивали на 0 день (перед обработкой) и на

7 и 11 дни после обработки. Уровни mRNA TMPRSS6 в печени и mRNA гепсидина в печени определяли при помощи qPCR, нормализовали к уровням mRNA GAPDH и выражали по отношению к уровням mRNA у мышей, только с введённым PBS. Гепсидин в сыворотке измеряли при помощи ELIS A (Intrinsic Life Sciences). Общее железо в сыворотке и коэффициент насыщения трансферрина (% TfSat) измеряли с использованием анализатора для биохимического анализа крови Olympus AU400. Каждый замер представляет собой среднее значение от трех мышей. Среднее квадратичное отклонение среднего представлено "усами".

Введение разовой дозы AD-60940 приводит к сильному и продолжительному подавлению mRNA TMPRSS6 в печени по отношению к контролю. Концентрацию mRNA TMPRSS6 подавляли больше чем на 90% в течение периода длительностью до трех недель после введения дозы в 3,0 мг/кг (фиг. 3A). Вследствие подавления концентрации mRNA TMPRSS6 в печени, уровни mRNA гепсидина повышались в два раза по сравнению с контролем (фиг. 3B), и концентрация гепсидина в сыворотке повышалась более чем в 2 раза по сравнению с контролем (фиг. 3C). Кроме того, общее железо в сыворотке (фиг. 3D) снижалось, и коэффициент насыщения трансферрина снижался более чем на 50% по сравнению с контролем (фиг. 3E). Снижения общего железа в сыворотке и коэффициента насыщения трансферрина были продолжительными в течение периода длительностью до трех недель после введения AD-60940. На фиг. 3F показана относительная концентрация mRNA TMPRSS6 в печени в зависимости от дозы AD-60940 на 11 день после введения. Каждый замер представляет собой максимальное подавление концентрации mRNA TMPRSS6, наблюдаемое при каждом уровне дозы. Данные согласовывали с уравнением Хилла.

Степень, до которой AD-60940 модулирует активацию гепсидина и железа в сыворотке, является практически одинаковой с таковой, наблюдаемой при предыдущих исследованиях на мышах Hbb^{th3/+} (Schmidt et al., Blood (2013), 121(7), 1200-1208) и указывает на то, что AD-60940 является потенциальным терапевтическим средством для RNAi для получения модифицирующих заболевание эффектов при β -талассемии.

Пример 8. In vivo эффект многодозового введения средства на основе iRNA к TMPRSS6.

Самкам мышей C57BL/6 вводили подкожную инъекцию AD-60940 в дозе 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг или только PBS (в качестве контроля) один раз в неделю в течение трех недель, затем умерщвляли через 7 дней после последней дозы (фиг. 4A). Оценивали по три мыши на дозу в отношении mRNA TMPRSS6 в печени, mRNA гепсидина в печени и коэффициента насыщения трансферрина. Уровни mRNA TMPRSS6 в печени и mRNA гепсидина в печени определяли при помощи qPCR, нормализовали к уровням mRNA GAPDH и выражали по отношению к уровням mRNA у мышей, только с введённым PBS. Коэффициент насыщения трансферрина (% TfSat) измеряли с использованием анализатора для биохимического анализа крови Olympus AU400. Каждый замер представляет собой среднее значение от трех мышей. Среднее квадратичное отклонение среднего представлено "усами".

Многодозовое введение 1,0 мг/кг AD-60940 приводило к более чем 90% подавлению концентрации mRNA TMPRSS6 (фиг. 4B). Концентрация mRNA гепсидина повышалась в два раза и коэффициент насыщения трансферрина снижался более чем на 50% по сравнению с контролем (фиг. 4B). На фиг. 4C показана относительная концентрация mRNA TMPRSS6 в печени в зависимости от дозы AD-60940. Данные согласовывали с уравнением Хилла. По этим данным видно, что многократная доза ED80 составляет менее 1,0 мг/кг.

По исследованию видно, что AD-60940 проявляет сильное и продолжительное подавление TMPRSS6, приводя к индукции гепсидина и системной задержке железа, и оно указывает на то, что AD-60940 является потенциальным терапевтическим средством для RNAi для получения модифицирующих заболевание эффектов при β -талассемии.

Пример 9. Связь между уровнями mRNA TMPRSS6 в печени, и концентрацией гепсидина в сыворотке, и коэффициентом насыщения трансферрина.

Данные, полученные при помощи AD-59743, AD-61002, AD-60940 и других средств на основе iRNA к TMPRSS6, далее анализировали для оценки связи между уровнями mRNA TMPRSS6 в печени, и уровнями гепсидина в сыворотке, и коэффициентом насыщения трансферрина. По концентрации гепсидина в сыворотке судят о нелинейной связи с уровнями mRNA TMPRSS6 при помощи уравнения Хилла (фиг. 5A). По коэффициенту насыщения трансферрина судят о линейной связи с уровнями mRNA TMPRSS6, если согласовано с уравнением простой линейной регрессии (фиг. 5B). Линейная связь между уровнями mRNA TMPRSS6 и коэффициентом насыщения трансферрина указывает, что задержка железа может быть определено и предсказуемо модулированной AD-60940. Концентрация гепсидина в сыворотке и относительные уровни mRNA гепсидина также указывают на линейную связь, если согласовано с уравнением простой линейной регрессии (фиг. 5C). В отличие от этого связь между коэффициентом насыщения трансферрина и концентрацией гепсидина в сыворотке была нелинейной и согласованной с уравнением Хилла (фиг. 5D).

Пример 10. In vivo тест разовой дозы.

Дуплексы siRNA к TMPRSS6 как показано на фиг. 6 оценивали на эффективность по их способно-

сти подавлять уровни mRNA TMPRSS6 в печени самок мышей C57BL/6 после введения дуплекса siRNA. Вводили разовую подкожную дозу в 3 мг/кг дуплекса siRNA к TMPRSS6, и мышей умерщвляли через 7 дней. Уровень mRNA TMPRSS6 в печени измеряли при помощи qPCR с использованием способов, описанных выше. Мыши в контрольной группе получали инъекцию PBS.

Уровни mRNA TMPRSS6 после введения дуплекса siRNA к TMPRSS6 показаны на фиг. 6. По результатам видно, что введение AD-60940, AD-59743 и AD-61002 приводило к значительному подавлению mRNA TMPRSS6 в печени, при этом AD60940 приводил к наибольшему сайленсингу. В частности, дуплекс siRNA к TMPRSS6, AD-60940, снижал mRNA TMPRSS6 более чем на 80% по сравнению с контролем. По данным также видно, что обработка AD-59743, AD-60940, AD-61002, AD-60994, AD-60998 и AD-61001 приводит к уменьшению уровня транскрипта TMPRSS6, которое сохраняется до 7 дня.

Пример 11. In vivo тест многократной дозы.

Дуплексы siRNA к TMPRSS6 как показано на фиг. 7 оценивали на эффективность по их способности подавлять уровни mRNA TMPRSS6 в печени мышей C57BL/6 дикого типа после введения дуплекса siRNA. Подкожная доза либо 0,3 мг/кг, либо 1,0 мг/кг дуплекса siRNA к TMPRSS6 вводили один раз в неделю в течение трех недель. Мышей умерщвляли на 7 день после последней дозы. Уровень mRNA TMPRSS6 в печени измеряли при помощи qPCR с использованием способов, описанных выше. Мыши в контрольной группе получали инъекцию PBS.

Уровни mRNA TMPRSS6 после введения дуплекса siRNA к TMPRSS6 показаны на фиг. 7. По результатом видно, что режим дозирования 1,0 мг/кг дуплекса siRNA к TMPRSS6, AD-60940, снижает mRNA TMPRSS6 более чем на 80% по сравнению с контролем.

Пример 12. Оптимизация AD-60940.

Основываясь на наблюдениях, что введение AD-60940 на долгий срок снижает mRNA TMPRSS6 более чем на 80% по сравнению с контролем, дополнительные siRNA, основанные на родительской последовательности AD-60940 с множеством химических модификаций, оценивали на эффективность в тестах разовой дозы при 10 нМ и 0,1 нМ путем трансфекции клеток Нер3В. Последовательности смысловой и антисмысловой нитей этих средств показаны в табл. 8, а результаты этого теста показаны в табл. 9. Данные в табл. 9 выражены как средняя доля оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю.

Кроме того, подмножество siRNA, описанное в таблицах 4 и 5, выше, модифицировали с замещением 2'F на 2'OMe-модификацию на 5'-конце смысловой нити и с добавлением 5'-фосфата на антисмысловую нить. Эти средства на основе siRNA также оценивали на эффективность in vitro при тестах разовой дозы при 10 нМ и 0,1 нМ путем трансфекции клеток Нер3В. Последовательности смысловой и антисмысловой нитей этих средств показаны в табл. 10, а результаты этого теста показаны в табл. 11. Данные в табл. 11 выражены как средняя доля оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю.

Таблица 8
Модифицированные последовательности TMPRSS6

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
AD-63214	A-126586.2	Y44CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	487	A-126587.2	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	544
AD-63240	A-122745.11	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	488	A-126607.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	545
AD-63209	A-126594.1	csusgguaUfuUfCfcUaggGfdTacaal96	489	A-122746.13	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	546
AD-63208	A-122745.6	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	490	A-126587.1	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	547
AD-63202	A-126586.1	Y44CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	491	A-122746.6	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	548
AD-63216	A-122745.7	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	492	A-126603.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	549
AD-63219	A-126617.1	gsgsUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	493	A-126618.1	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	550
AD-63228	A-122745.9	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	494	A-126605.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	551
AD-63205	A-122745.13	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	495	A-126609.1	usUfsgUfaccCfuaggaAfaUfaccAfgsasg	552
AD-63241	A-126589.2	csusgguaUfuUfCfcUaggGfuacaal96	496	A-126611.3	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	553
AD-63243	A-126621.3	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	497	A-126624.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	554
AD-63203	A-126593.1	csusgguaUfuUfCfcUaggGfuadCaal96	498	A-122746.12	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	555
AD-63223	A-122745.16	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	499	A-126612.1	usUfsguaCfccuaggaAfaUfaccagsasg	556
AD-63231	A-126621.1	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	500	A-126622.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	557
AD-63199	A-122745.12	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	501	A-126608.1	usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg	558
AD-63217	A-122745.15	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	502	A-126611.1	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	559
AD-63229	A-122745.17	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	503	A-126613.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	560
AD-63255	A-126621.5	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	504	A-126626.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	561
AD-63226	A-126589.1	csusgguaUfuUfCfcUaggGfuacaal96	505	A-122746.8	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	562
AD-63211	A-122745.14	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	506	A-126610.1	usUfsgUfaccuAfggaAfaUfaccAfgsasg	563
AD-63273	A-126621.8	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	507	A-126629.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	564
AD-60940	A-122745.1	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	508	A-122746.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	565
AD-63249	A-126621.4	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	509	A-126625.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	566
AD-63256	A-122745.19	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	510	A-126634.1	usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	567
AD-63280	A-126639.1	csusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	511	A-126587.3	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	568
AD-63237	A-126621.2	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	512	A-126623.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	569
AD-63285	A-126621.10	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	513	A-126631.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	570
AD-63215	A-126595.1	csusgguaUfuUfCfdCuaggGfuacaal96	514	A-122746.14	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	571
AD-63222	A-122745.8	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	515	A-126604.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	572
AD-63232	A-126590.1	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	516	A-122746.9	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	573
AD-63218	A-126594.2	csusgguaUfuUfCfcUaggGfdTacaal96	517	A-126611.7	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	574
AD-63261	A-126621.6	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	518	A-126627.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	575
AD-63267	A-126621.7	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	519	A-126628.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	576
AD-63234	A-122745.10	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	520	A-126606.1	usUfsguaCfccuAfggaAfaUfaccagsasg	577
AD-63250	A-122745.18	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	521	A-126633.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	578
AD-63212	A-126593.2	csusgguaUfuUfCfcUaggGfuadCaal96	522	A-126611.6	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	579
AD-63210	A-126602.1	csusgguaUUUUCuaggG(Tgn)acaal96	523	A-122746.21	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	580
AD-63244	A-126621.11	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	524	A-126632.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	581
AD-63235	A-126588.2	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	525	A-126611.2	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	582
AD-63279	A-126621.9	csusGfguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	526	A-126630.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfafuaCfcAfgsasg	583
AD-63227	A-126597.1	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	527	A-122746.16	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	584
AD-63220	A-126588.1	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	528	A-122746.7	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	585
AD-63238	A-126591.1	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	529	A-122746.10	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	586
AD-63242	A-126598.2	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	530	A-126611.11	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	587
AD-63239	A-126599.1	csusgguaUUUUCfdTagguacaal96	531	A-122746.18	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	588
AD-63233	A-126598.1	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	532	A-122746.17	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	589
AD-63268	A-126636.1	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	533	A-122746.22	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	590
AD-63221	A-126596.1	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	534	A-122746.15	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	591
AD-63236	A-126597.2	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	535	A-126611.10	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	592
AD-63197	A-126592.1	csusgguaUUUUCUfagguacaal96	536	A-122746.11	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	593
AD-63224	A-126595.2	csusgguaUfuUfCfdCuaggGfuacaal96	537	A-126611.8	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	594
AD-63200	A-126590.2	csusgguaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	538	A-126611.4	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	595
AD-63262	A-122745.20	CfsusGfgUfaUfuUfCfcUfaAfgGfgUfaCfaAfl96	539	A-126635.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	596

AD-63204	A-126601.1	csusgguaauucdCuaggguaacaal96	540	A-122746.20	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsag	597
AD-63230	A-126596.2	csusgguaFuuuuCfuaggguaadCaal96	541	A-126611.9	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsag	598
AD-63198	A-126600.1	csusgguaauucdCdTaggguaacaal96	542	A-122746.19	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsag	599
AD-63206	A-126591.2	csusgguaFuuuuCfuaggguaacaal96	543	A-126611.5	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsag	600

Таблица 9
Тест разовой дозы ТМРСС6

	10 нМ	0,1 нМ
ID дуплекса	Средн.	Средн.
AD-63214	12,40	19,46
AD-63240	12,29	27,03
AD-63209	17,11	23,38
AD-63208	14,77	23,31
AD-63202	14,87	27,08
AD-63216	15,97	34,05
AD-63219	18,47	27,82
AD-63228	19,44	34,52
AD-63205	15,44	38,23
AD-63241	18,81	41,42
AD-63243	19,15	30,87
AD-63203	17,06	42,12
AD-63223	21,98	27,52
AD-63231	22,42	30,68
AD-63199	17,74	39,50
AD-63217	18,81	38,99
AD-63229	22,33	33,42
AD-63255	21,06	34,31
AD-63226	18,36	41,65
AD-63211	26,00	32,07
AD-63273	23,11	34,96
AD-60940	22,99	34,34
AD-63249	30,83	28,35
AD-63256	23,18	35,19
AD-63280	25,10	32,42
AD-63237	23,95	35,43
AD-63285	21,53	39,60
AD-63215	29,27	42,54
AD-63222	23,88	38,24
AD-63232	30,29	35,04
AD-63218	27,02	37,31
AD-63261	24,22	46,61
AD-63267	28,32	38,90
AD-63234	24,42	55,83
AD-63250	26,77	47,92
AD-63212	28,43	46,01
AD-63210	27,91	44,35

AD-63244	30,66	45,65
AD-63235	32,75	51,82
AD-63279	38,00	48,80
AD-63227	33,15	58,12
AD-63220	38,31	54,08
AD-63238	45,56	51,50
AD-63242	47,96	54,26
AD-63239	51,98	49,22
AD-63233	51,37	65,83
AD-63268	41,22	82,16
AD-63221	57,02	65,11
AD-63236	49,86	71,66
AD-63197	47,67	78,29
AD-63224	67,73	60,88
AD-63200	62,89	67,68
AD-63262	64,25	79,72
AD-63204	68,01	80,99
AD-63230	66,88	81,04
AD-63198	65,67	78,28
AD-63206	65,10	82,71

Таблица 10
Модифицированные последовательности TМPRSS6

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
AD-63214	A-126586.2	Y44CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	601	A-126587.2	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	658
AD-63240	A-122745.11	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	602	A-126607.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	659
AD-63209	A-126594.1	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfdTacaal96	603	A-122746.13	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	660
AD-63208	A-122745.6	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	604	A-126587.1	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	661
AD-63202	A-126586.1	Y44CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	605	A-122746.6	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	662
AD-63216	A-122745.7	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	606	A-126603.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	663
AD-63219	A-126617.1	gsgsUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	607	A-126618.1	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	664
AD-63228	A-122745.9	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	608	A-126605.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	665
AD-63205	A-122745.13	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	609	A-126609.1	usUfsgUfaccCfuaggaAfaUfaccAfgsasg	666
AD-63241	A-126589.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaal96	610	A-126611.3	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	667
AD-63243	A-126621.3	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	611	A-126624.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	668
AD-63203	A-126593.1	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuadCaaL96	612	A-122746.12	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	669
AD-63223	A-122745.16	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	613	A-126612.1	usUfsguaCfccuaggaAfaUfaccagsasg	670
AD-63231	A-126621.1	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	614	A-126622.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	671
AD-63199	A-122745.12	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	615	A-126608.1	usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg	672
AD-63217	A-122745.15	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	616	A-126611.1	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	673
AD-63229	A-122745.17	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	617	A-126613.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	674
AD-63255	A-126621.5	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	618	A-126626.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	675
AD-63226	A-126589.1	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaal96	619	A-122746.8	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	676
AD-63211	A-122745.14	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	620	A-126610.1	usUfsgUfaccuAfggaAfaUfaccAfgsasg	677
AD-63273	A-126621.8	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	621	A-126629.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg	678
AD-60940	A-122745.1	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	622	A-122746.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	679
AD-63249	A-126621.4	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	623	A-126625.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaUfCfcAfgsasg	680
AD-63256	A-122745.19	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	624	A-126634.1	usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	681
AD-63280	A-126639.1	csusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	625	A-126587.3	PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	682
AD-63237	A-126621.2	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	626	A-126623.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	683

AD-63285	A-126621.10	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	627	A-126631.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaFuAfccAfgsasg	684
AD-63215	A-126595.1	csusgguaUfuUfCfdCuaggGfuacaaL96	628	A-122746.14	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	685
AD-63222	A-122745.8	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	629	A-126604.1	usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg	686
AD-63232	A-126590.1	csusgguaUfuUfCfUfagGfgfuacaaL96	630	A-122746.9	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	687
AD-63218	A-126594.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfdTacaal96	631	A-126611.7	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	688
AD-63261	A-126621.6	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	632	A-126627.1	usUfsGfuaCfcCfuAfggaAfaFuAfcCagsasg	689
AD-63267	A-126621.7	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	633	A-126628.1	usUfsGfuAfcCfuAfggaAfaFuAfcCagsasg	690
AD-63234	A-122745.10	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	634	A-126606.1	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccAfgsasg	691
AD-63250	A-122745.18	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	635	A-126633.1	ususUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	692
AD-63212	A-126593.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuadCaaL96	636	A-126611.6	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	693
AD-63210	A-126602.1	csusgguaauucdCuagg(Tgn)acaaL96	637	A-122746.21	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	694
AD-63244	A-126621.11	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	638	A-126632.1	usUfsGfuAfcCfuAfggaAfaFuAfccAfgsasg	695
AD-63235	A-126588.2	csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	639	A-126611.2	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	696
AD-63279	A-126621.9	csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	640	A-126630.1	usUfsGfuAfcCfuAfggaAfaFuAfccagsasg	697
AD-63227	A-126597.1	csusgguaUfuUfCfCfuaggdTacaal96	641	A-122746.16	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	698
AD-63220	A-126588.1	csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	642	A-122746.7	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	699
AD-63238	A-126591.1	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaaL96	643	A-122746.10	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	700
AD-63242	A-126598.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaaL96	644	A-126611.11	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	701
AD-63239	A-126599.1	csusgguaauucCfdTagguacaaL96	645	A-122746.18	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	702
AD-63233	A-126598.1	csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	646	A-122746.17	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	703
AD-63268	A-126636.1	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	647	A-122746.22	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	704
AD-63221	A-126596.1	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaaL96	648	A-122746.15	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	705
AD-63236	A-126597.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggdTacaal96	649	A-126611.10	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	706
AD-63197	A-126592.1	csusgguaauucCfUfagguacaaL96	650	A-122746.11	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	707
AD-63224	A-126595.2	csusgguaUfuUfCfdCuaggGfuacaaL96	651	A-126611.8	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	708
AD-63200	A-126590.2	csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfaaL96	652	A-126611.4	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	709
AD-63262	A-122745.20	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96	653	A-126635.1	usUfsgUfaCfcCfuAfggaaUfaCfcAfgsasg	710
AD-63204	A-126601.1	csusgguaauucdCuaggGfuacaaL96	654	A-122746.20	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	711
AD-63230	A-126596.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaaL96	655	A-126611.9	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	712
AD-63198	A-126600.1	csusgguaauucdCdTagguacaaL96	656	A-122746.19	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	713
AD-63206	A-126591.2	csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuacaaL96	657	A-126611.5	usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg	714

Таблица 11
Тест разовой дозы TMPRSS6

ID дуплекса	10 нМ		0,1 нМ	
	Средн.	SD	Средн.	SD
AD-60998	26,1	3,1	42,9	13,3
AD-60970	24,3	9,3	39,0	24,2
AD-61002	27,5	8,5	32,1	9,8
AD-60994	19,9	5,8	28,2	9,3
AD-60992	57,9	15,4	67,5	13,6
AD-61006	25,8	2,5	33,4	8,7
AD-59743	21,1	3,2	31,7	8,1
AD-60966	64,6	15,6	76,0	18,2
AD-60952	44,1	10,7	76,9	16,5
AD-61000	37,2	5,8	43,3	12,7
AD-60949	94,9	22,3	91,3	13,2
AD-60969	100,7	18,5	124,5	43,0
AD-60967	93,7	6,4	112,1	31,5
AD-60984	44,7	21,4	58,2	9,6
AD-60943	65,6	11,0	61,7	9,8
AD-61001	69,2	8,3	100,8	8,4
AD-60986	38,9	13,9	58,9	4,8
AD-60988	61,7	12,0	68,6	15,2
AD-60993	92,1	13,1	86,5	10,0
AD-60987	113,9	15,3	97,9	21,0
AD-60997	54,8	7,2	75,8	16,4
AD-60973	61,5	15,7	80,8	9,3
AD-61005	116,8	23,4	128,1	10,8
AD-60985	71,2	15,1	78,7	14,6
AD-61003	101,0	15,2	97,5	15,8
AD-60989	75,8	9,8	97,2	20,8
AD-60955	108,6	23,4	102,0	16,6
AD-60991	96,6	19,4	95,6	12,4
AD-61004	111,1	6,4	110,9	18,3
AD-60961	96,9	36,0	84,1	28,2
AD-60999	106,7	12,7	92,3	24,6
AD-60990	92,9	38,4	97,6	16,8
AD-60996	71,2	7,5	101,5	8,9

Пример 13. Оптимизация AD-60940.

Получали дополнительные дуплексы, нацеливающиеся на TMPRSS6, и проводили их отбор *in vitro* в отношении эффективности с использованием материалов и способов, указанных ниже.

Конструирование, синтез и проведение отбора *in vitro* дополнительных siRNA.

Конструирование siRNA.

Дуплексы TMPRSS6, 19 нуклеотидов в длину как для смысловой, так и для антисмысловой нити, конструировали с использованием последовательности mRNA TMPRSS6 человека, изложенной в GenBank под номером доступа NM_153609.3. Первоначально выявляли три тысячи сто восемьдесят дуплексов, которые не содержали повторений длиннее 7 нуклеотидов, охватывающих практически в целом 3209-нуклеотидный транскрипт. Всем 3180 дуплексам затем присваивали балл в отношении прогнозированной эффективности в соответствии с линейной моделью, которая оценивала нуклеотидную пару в каждом положении дуплекса, и дозу, и клеточную линию, используемые для проведения отбора. Дуплексы также противопоставляли всем транскриптам в коллекции эталонных последовательностей человека с использованием индивидуального алгоритма "грубой силы", и присваивали балл для наименьшего количества ошибочных совпадений (на нить) с транскриптами, отличными от TMPRSS6. Дуплексы, которые синтезировали и отбирали, затем выбирали из 3180 в соответствии со следующей схемой: начиная с 5'-конца транскрипта дуплекс выбирали в пределах "окна" каждых 10 ± 2 нуклеотидов, которые обладали наивысшей прогнозированной эффективностью, обладали по меньшей мере одним ошибочным несопадением в обеих нитях по отношению ко всем транскриптам, отличным от TMPRSS6, и еще не были синтезированы или отобраны как часть других наборов дуплексов. В тех случаях, если не выявляли ни одного дуплекса в пределах данного окна, который удовлетворял бы всем признакам, это окно пропускали. Триста три дуплекса были выбраны в соответствии с вышеуказанными признаками. Также были выбраны дополнительные 31 дуплекс.

Детальный перечень 334 последовательностей смысловой и антисмысловой нити TMPRSS6 показан в табл. 12.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Her3B2.1-7 получали из Американской коллекции типовых культур (Rockville, Md., номер по кат. HB-8064) и культивировали в EMEM (ATCC № 30-2003), дополненной так, что она содержала 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) (Biochrom AG, Берлин, Германия, номер по кат. S0115) и пенициллином 100 ед./мл, стрептомицином 100 мг/мл (Biochrom AG, Берлин, Германия, номер по кат. A2213), при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ во влажной камере (Heraeus HERAcCell, Kendro Laboratory Products, Лангензельбольд, Германия).

Трансфекцию dsRNA осуществляли непосредственно после посева 15000 клеток/лунка в 96-луночный планшет и выполняли с Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Карлсруэ, Германия, номер по кат. 11668-019), как описано производителем. Трансфекции осуществляли в четырех экземплярах и dsRNA трансфецировали при концентрации 10 нМ.

Анализы с разветвленной ДНК - QunatiGene 2.0 (Panomics, № по кат. QS0011)

Для количественного определения mRNA TMPRSS6 клетки собирали через 24 ч после трансфекции и лизировали при 53°C, следуя процедурам, рекомендованным производителем набора "Quantigene II Kit" для TMPRSS6 и "Quantigene I Explore Kit" для bDNA (Panomics, Фримонт, Калифорния, США, номер по кат. 15735 или QG0004, соответственно). Затем 50 мкл лизатов инкубировали с наборами зондов, специфичных к TMPRSS6 человека, и 10 мкл лизатов для GAPDH человека и обрабатывали в соответствии с протоколом производителя для QuantiGene. Хемоллюминесценцию измеряли в Victor2-Light (Perkin Elmer, Висбаден, Германия) как RLU (относительные световые единицы) и значения, полученные с набором зондов для TMPRSS6 человека, нормализовали к соответствующим значениям для GAPDH человека для каждой лунки и затем устанавливали связь со средним трех несвязанных контрольных dsRNA.

In vitro эффективность соединений показана в табл. 13.

Таблица 12

Дополнительные модифицированные siRNA к TMPRSS6

ID дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	ID смысловой	Положение в NM_153609.3	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	ID антисмысловой
AD-63290.1	UGAGCCAGACCCAGUCCAGdTdT	715	A-126858.1	3-21	CUGGACUGGGUCUGGCUCAdTdT	1049	A-126859.1
AD-63296.1	GACCCAGUCCAGCUCUGGUdTdT	716	A-126860.1	10-28	ACCAGAGCUGGACUGGGUCdTdT	1050	A-126861.1
AD-63302.1	CUCUGGUGCCUGCCUCUGdTdT	717	A-126862.1	22-40	CAGAGGGCAGGCACCAGAdTdT	1051	A-126863.1
AD-63308.1	GCCUCUGGUGCGAGCUGAdTdT	718	A-126864.1	33-51	UCAGCUCGCACCAGAGGGCdTdT	1052	A-126865.1
AD-63314.1	GGUGCGAGCUGACCUAGAdTdT	719	A-126866.1	40-58	UCUCAGGUCAGCUCGCACcTdTdT	1053	A-126867.1
AD-63320.1	UGACCUAGAGAUCCACUUCcTdTdT	720	A-126868.1	49-67	GGAAUGUCAUCUCAGGUCAdTdT	1054	A-126869.1
AD-63326.1	UGCACUUCUCCUUCUGUdTdT	721	A-126870.1	59-77	CACAGAGGAGGGAAGUGCAdTdT	1055	A-126871.1
AD-63332.1	CUGUGAGCUGUCUCGGCAdTdT	722	A-126872.1	73-91	GUGCCGAGACAGCUCACAGdTdT	1056	A-126873.1
AD-63291.1	GUCUCGGCACCCACUUGCAdTdT	723	A-126874.1	82-100	UGCAAGUGGGUGCCGAGAdTdT	1057	A-126875.1
AD-63297.1	CCACUUGCAGUCACUGCCGdTdT	724	A-126876.1	92-110	CGGCAGUGACUGCAAGUGdTdT	1058	A-126877.1
AD-63303.1	GUCACUGCCGCCUGAUGUdTdT	725	A-126878.1	101-119	AACAUCAGGCGGCAGUGAdTdT	1059	A-126879.1
AD-63309.1	GCCUGAUGUUGUACUCUdTdT	726	A-126880.1	110-128	AAGAGUAACAACAUAGGCdTdT	1060	A-126881.1
AD-63315.1	UUACUCUCCACUCCAAAAdTdT	727	A-126882.1	121-139	UUUUGGAGUGGAAGUAAdTdT	1061	A-126883.1
AD-63321.1	ACUCCAAAAGGAUGCCCGUdTdT	728	A-126884.1	131-149	ACGGGCAUCCUUUGGAGUdTdT	1062	A-126885.1
AD-63327.1	UGCCCGUGGCCAGGCCcTdTdT	729	A-126886.1	143-161	GGGGCCUCGGCCACGGCCAdTdT	1063	A-126887.1
AD-63333.1	UGGCCGAGGCCCCAGGUdTdT	730	A-126888.1	149-167	ACCUGGGGGCCUCGGCCAdTdT	1064	A-126889.1
AD-63292.1	CCAGGUGCUGGCGGGCAGdTdT	731	A-126890.1	162-180	CUGCCCGCCAGCCACUGGdTdT	1065	A-126891.1
AD-63298.1	GCGGGCAGGGGACGGAGdTdT	732	A-126892.1	173-191	CCUCCGUCCCCUGCCCGdTdT	1066	A-126893.1
AD-63304.1	GGACGGAGGUGAUGGCGAdTdT	733	A-126894.1	183-201	CUCGCCAUCCUCCGUCCdTdT	1067	A-126895.1
AD-63310.1	GUGAUGGGCAGGAAGCGAdTdT	734	A-126896.1	191-209	UCCGUUCCUCGCCAUACAdTdT	1068	A-126897.1
AD-63316.1	GAAGCGGAGCCGGAGGGAdTdT	735	A-126898.1	202-220	UCCCUCCGGUCCCGUUCdTdT	1069	A-126899.1
AD-63322.1	GCCGGAGGGGAUGUCAAAdTdT	736	A-126900.1	210-228	CUUGAACAUCCUCCGGCdTdT	1070	A-126901.1
AD-63328.1	UGUUAAGGCCUGUGAGAdTdT	737	A-126902.1	221-239	UCCUCACAGGCCUUGAACAdTdT	1071	A-126903.1

AD-63334.1	CUGUGAGGACUCCAAGAGAdTdT	738	A-126904.1	231-249	UCUCUUGGAGUCCUCACAGdTdT	1072	A-126905.1
AD-63293.1	ACUCCAAGAGAAAAGCCGdTdT	739	A-126906.1	239-257	CGGGCUUUUCUCUUGGAGUdTdT	1073	A-126907.1
AD-63299.1	GCCCGGGGUACCUCCGdTdT	740	A-126908.1	253-271	GGGGGAGGUAGCCCGGGdTdT	1074	A-126909.1
AD-63305.1	ACCUCGCGGUGGUGCCCUdTdT	741	A-126910.1	263-281	AGGGGACCAGCGGAGGUdTdT	1075	A-126911.1
AD-63311.1	GCCUGGUGCCCUUUUGUdTdT	742	A-126912.1	269-287	ACAAACAGGGGACCAGGdTdT	1076	A-126913.1
AD-63317.1	UGUUUGUGUGUGCCCUdTdT	743	A-126914.1	281-299	AGGGCCAGCAGCACAACdTdT	1077	A-126915.1
AD-63323.1	UGCUGGCCUCGUCGUCdTdT	744	A-126916.1	290-308	AGCACGAGCAGGGCCAGCAdTdT	1078	A-126917.1
AD-63329.1	GCUCGUGUGUCUCGCGdTdT	745	A-126918.1	300-318	CGCCGAAGCCAGCAGCAdTdT	1079	A-126919.1
AD-63335.1	UCGGCGGGGUGUACUCUdTdT	746	A-126920.1	313-331	AGAGUAGCACCCCGCAdTdT	1080	A-126921.1
AD-63294.1	CGGGGGGUGUCUACUCGdTdT	747	A-126922.1	314-332	CAGAGUAGCACCCCGCAdTdT	1081	A-126923.1
AD-63300.1	GGGGGGGUGUCUACUCGdTdT	748	A-126924.1	315-333	CCAGAGUAGCACCCCGCAdTdT	1082	A-126925.1
AD-63306.1	GCGGGGUGUACUCUGGUdTdT	749	A-126926.1	316-334	ACCAGAGUAGCACCCCGCAdTdT	1083	A-126927.1
AD-63312.1	CGGGGUGUCUACUCUGUAdTdT	750	A-126928.1	317-335	UACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1084	A-126929.1
AD-63318.1	GGGGGUGUCUACUCUGUAdTdT	751	A-126930.1	318-336	AUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1085	A-126931.1
AD-63324.1	GGGUGUCUACUCUGUAdTdT	752	A-126932.1	320-338	AAAUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1086	A-126933.1
AD-63330.1	GGUGUCUACUCUGUAdTdT	753	A-126934.1	321-339	GAAAUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1087	A-126935.1
AD-63336.1	GUGUCUACUCUGUAdTdT	754	A-126936.1	322-340	GGAAUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1088	A-126937.1
AD-63295.1	GCUACUCUGUAdTdT	755	A-126938.1	324-342	UAGGAAUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1089	A-126939.1
AD-63301.1	CUACUCUGUAdTdT	756	A-126940.1	325-343	CUAGGAAUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT	1090	A-126941.1
AD-63307.1	UACUCUGUAdTdT	757	A-126942.1	326-344	CCUAGGAAUACCAGAGUAdTdT	1091	A-126943.1
AD-63313.1	ACUCUGUAdTdT	758	A-126944.1	327-345	CCCUAGGAAUACCAGAGUAdTdT	1092	A-126945.1
AD-63319.1	CUCUGUAdTdT	759	A-126946.1	328-346	ACCUAGGAAUACCAGAGdTdT	1093	A-126947.1
AD-63325.1	CUGGUAdTdT	760	A-126948.1	330-348	GUACCUAGGAAUACCAGdTdT	1094	A-126949.1
AD-63331.1	GUAdTdT	761	A-126950.1	333-351	CUUGUACCUAGGAAUAdTdT	1095	A-126951.1
AD-63337.1	UAdTdT	762	A-126952.1	334-352	CCUUGUACCUAGGAAUAdTdT	1096	A-126953.1
AD-63343.1	AUUUCCUAGGUAACAAGGdTdT	763	A-126954.1	335-353	GCCUUGUACCUAGGAAUAdTdT	1097	A-126955.1
AD-63349.1	UUUCCUAGGUAACAAGGdTdT	764	A-126956.1	336-354	CGCCUUGUACCUAGGAAUAdTdT	1098	A-126957.1
AD-63355.1	UUUCCUAGGUAACAAGGdTdT	765	A-126958.1	337-355	CCGCCUUGUACCUAGGAAUAdTdT	1099	A-126959.1
AD-63361.1	CCUAGGUAACAAGGdTdT	766	A-126960.1	339-357	CUCCGCCUUGUACCUAGGdTdT	1100	A-126961.1
AD-63367.1	CUAGGUAACAAGGdTdT	767	A-126962.1	340-358	CCUCCGCCUUGUACCUAGdTdT	1101	A-126963.1
AD-63373.1	UAGGUAACAAGGdTdT	768	A-126964.1	341-359	ACCUCCGCCUUGUACCUAdTdT	1102	A-126965.1
AD-63379.1	AGGUAACAAGGdTdT	769	A-126966.1	342-360	CACCUCCGCCUUGUACCUdTdT	1103	A-126967.1
AD-63388.1	GGUAACAAGGdTdT	770	A-126968.1	343-361	UCACCUCCGCCUUGUACCCdTdT	1104	A-126969.1
AD-63344.1	GGUAACAAGGdTdT	771	A-126970.1	344-362	AUCACCUCCGCCUUGUACCCdTdT	1105	A-126971.1
AD-63350.1	GUACAAGGdTdT	772	A-126972.1	345-363	CAUCACCUCCGCCUUGUACdTdT	1106	A-126973.1
AD-63356.1	UACAAGGdTdT	773	A-126974.1	346-364	CCAUCACCUCCGCCUUGUAdTdT	1107	A-126975.1
AD-63362.1	ACAAGGdTdT	774	A-126976.1	347-365	ACCAUCACCUCCGCCUUGUdTdT	1108	A-126977.1
AD-63368.1	CAAGGdTdT	775	A-126978.1	348-366	GACCAUCACCUCCGCCUUGdTdT	1109	A-126979.1
AD-63374.1	AAGGdTdT	776	A-126980.1	349-367	UGACCAUCACCUCCGCCUdTdT	1110	A-126981.1
AD-63380.1	AGGdTdT	777	A-126982.1	350-368	CUGACCAUCACCUCCGCCUdTdT	1111	A-126983.1
AD-63339.1	UGAUGUCAGCAGGdTdT	778	A-126984.1	359-377	UACACCUCCGCCUAGCAdTdT	1112	A-126985.1
AD-63345.1	CCAGGUGUACUCAGGdTdT	779	A-126986.1	369-387	ACUGCCUGAGUACACCUCCGdTdT	1113	A-126987.1
AD-63351.1	GCAGUCGCGUACUAdTdT	780	A-126988.1	383-401	UUGAGUACACGAGCAGCAdTdT	1114	A-126989.1
AD-63357.1	GCGUACUCUACUAdTdT	781	A-126990.1	390-408	GUGGCGUUGAGUACACGdTdT	1115	A-126991.1
AD-63363.1	UCGCCAUUCCUCCAGGAdTdT	782	A-126992.1	402-420	AUCCUGGAGAGUUGGCGAdTdT	1116	A-126993.1
AD-63369.1	CUCCAGGAUCUACCCGdTdT	783	A-126994.1	411-429	GCGGGUAGAUCCUGGAGdTdT	1117	A-126995.1
AD-63375.1	UACCCGCCGGAAUCUAGUdTdT	784	A-126996.1	423-441	ACUAGAUUCCCGGGUAdTdT	1118	A-126997.1
AD-63381.1	CCGGAAUCUAGUCCUAdTdT	785	A-126998.1	429-447	GAAGGCACUAGAUUCCCGdTdT	1119	A-126999.1
AD-63340.1	AGUGCUUCCGAGUAAAdTdT	786	A-127000.1	439-457	UUUCACUGCGGAAGCACUdTdT	1120	A-127001.1
AD-63346.1	GUGAAACCGCCAAAGCCAdTdT	787	A-127002.1	452-470	UGGGCUUUGGCGGUUCACdTdT	1121	A-127003.1
AD-63352.1	CGCAAAGCCAGAAUAdTdT	788	A-127004.1	459-477	CAUCUUCUGGCUUUGGCGdTdT	1122	A-127005.1
AD-63358.1	CAGAAGUAGCUCAAGGdTdT	789	A-127006.1	469-487	GCUCUUGAGCAUCUUCGdTdT	1123	A-127007.1
AD-63364.1	UCAAGGAGUCUACACAGdTdT	790	A-127008.1	479-497	CUGGUGAUGAGCUCCUUGAdTdT	1124	A-127009.1
AD-63370.1	ACCAGACCCGCCUGGAAAdTdT	791	A-127010.1	493-511	UUCCAGGCGGUGCUGUdTdT	1125	A-127011.1
AD-63376.1	GCCUGGAAUCUACUAdTdT	792	A-127012.1	503-521	UUGUAGUAAAUCCAGGdTdT	1126	A-127013.1
AD-63382.1	GAACUACUACUACUAdTdT	793	A-127014.1	509-527	CUGGAGUUGUAGUAGUAdTdT	1127	A-127015.1
AD-63341.1	AACUCAGCUCCUACUAdTdT	794	A-127016.1	520-538	AAUAGACGAGCUGGAGUdTdT	1128	A-127017.1
AD-63347.1	CCGUACUUCUUCUGGAdTdT	795	A-127018.1	530-548	UCCCCAAGGAAUAGACGdTdT	1129	A-127019.1
AD-63353.1	UUGGGAGGGACCCUACdTdT	796	A-127020.1	542-560	GUGAGGGUCCUCCCAAdTdT	1130	A-127021.1
AD-63359.1	CCCCACCUUCUUCUAdTdT	797	A-127022.1	553-571	AGAAGAAGCAGGUGAGGdTdT	1131	A-127023.1

AD-63365.1	CUGUUCUUCUGGUUCAUdTdT	798	A-127024.1	561-579	AAUGAACCCAGAAGAAGCAGdTdT	1132	A-127025.1
AD-63371.1	CUGGUUCAUUCUCAAUdTdT	799	A-127026.1	570-588	GAUUUGGAGAAUGAACCCAGdTdT	1133	A-127027.1
AD-63377.1	UCUCCAAUCCCGAGCAdTdT	800	A-127028.1	579-597	GUGUCUGGGGAUUUGGAGdTdT	1134	A-127029.1
AD-63383.1	CCGAGCACCCCGGUGAUdTdT	801	A-127030.1	590-608	AUCAGCCGGCGGUCUCGdTdT	1135	A-127031.1
AD-63342.1	GGCUGAUGCUGAGCCCCAdTdT	802	A-127032.1	602-620	UCGGGGCUCAGCAUCAGCCdTdT	1136	A-127033.1
AD-63348.1	UGAGCCCCGAGGUGGUCAdTdT	803	A-127034.1	611-629	UGCACCACUCGGGGCUCAdTdT	1137	A-127035.1
AD-63354.1	UGGUGCAGGCACUCUGGdTdT	804	A-127036.1	623-641	ACCAGCAGUGCCGACCAAdTdT	1138	A-127037.1
AD-63360.1	AGGCACUCUGGUGGAGdTdT	805	A-127038.1	629-647	UCCUCCACCAGCAGUCUdTdT	1139	A-127039.1
AD-63366.1	GUGGAGGAGCUCUGUCCAdTdT	806	A-127040.1	640-658	UGGACAGCAGCUCUCCAdTdT	1140	A-127041.1
AD-63372.1	UGUCCACAGUCAACAGCUCdTdT	807	A-127042.1	653-671	GAGCUGUUGACUGUGGACAdTdT	1141	A-127043.1
AD-63378.1	UCAACAGCUCGGUCGCGdTdT	808	A-127044.1	662-680	ACGGCAGCCGAGCUGUUGdTdT	1142	A-127045.1
AD-63384.1	UCGGCUGCCUCUCCUACAdTdT	809	A-127046.1	670-688	UGUAGGGGACGGCAGCCAdTdT	1143	A-127047.1
AD-63390.1	AGUGGACCCCGAGGGCCUdTdT	810	A-127048.1	702-720	UAGGCCUUCGGGGUCCAUdTdT	1144	A-127049.1
AD-63396.1	AGGGCCUAGUGAUCUGGAdTdT	811	A-127050.1	713-731	UCCAGGAUCACUAGGCCUdTdT	1145	A-127051.1
AD-63402.1	UAGUGAUCUGGAAGCCAdTdT	812	A-127052.1	719-737	CUGGCUCCAGGAUCACUdTdT	1146	A-127053.1
AD-63408.1	AAGCCAGUGGAAAGCAUdTdT	813	A-127054.1	731-749	AUGUCUUUCACACUGGCUdTdT	1147	A-127055.1
AD-63414.1	UGAAAGACAUAGCUGAUdTdT	814	A-127056.1	740-758	AAUGCAGCAUUGUCUUAdTdT	1148	A-127057.1
AD-63420.1	UGCAUUGAAUCCACGCUdTdT	815	A-127058.1	753-771	CAGCGUGGAAUCAAUGCAdTdT	1149	A-127059.1
AD-63426.1	CUACAGCUACGUGGCCAdTdT	816	A-127060.1	783-801	CUGGCCACGUAUGCUAGdTdT	1150	A-127061.1
AD-63385.1	CUACGUGGCCAGGGCCAdTdT	817	A-127062.1	789-807	CUGGCCUGGCCACGUAAdTdT	1151	A-127063.1
AD-63391.1	AGGGCCAGGUCCUCCGCUdTdT	818	A-127064.1	800-818	AGCCGGAGGACCUUGGCCUdTdT	1152	A-127065.1
AD-63397.1	CCGGCUGAAGGGCCUGAdTdT	819	A-127066.1	813-831	GUCAGGCCUUCAGCCGdTdT	1153	A-127067.1
AD-63403.1	GGGCCUGACCACCUUGCCUdTdT	820	A-127068.1	823-841	AGGCCAGGUGGUCAGGCCdTdT	1154	A-127069.1
AD-63409.1	CCACCUGGCCUCCAGCUGdTdT	821	A-127070.1	831-849	GCAGCUGGAGGCCAGUGdTdT	1155	A-127071.1
AD-63415.1	CCAGCUGCCUGUGGCACUdTdT	822	A-127072.1	842-860	AGGUGCCACAGGCAGUGdTdT	1156	A-127073.1
AD-63421.1	CUGUGCACCUCAGGGCCdTdT	823	A-127074.1	850-868	GGCCUCCAGGUGCCACAdTdT	1157	A-127075.1
AD-63427.1	CUGCAGGGCCCAAGGACdTdT	824	A-127076.1	859-877	GGUCCUUGGGCCUCAGdTdT	1158	A-127077.1
AD-63386.1	CAAAGACCUCAUGCUAdTdT	825	A-127078.1	869-887	UUGAGCAUGAGGUCCUUGdTdT	1159	A-127079.1
AD-63392.1	UGCUAAACUCCGCGUGAdTdT	826	A-127080.1	881-899	UCCAGCCGAGUUUGAGCAdTdT	1160	A-127081.1
AD-63398.1	CCGGCUGGAGUGGACGCUdTdT	827	A-127082.1	891-909	CAGCGUCCACUCCAGCCGdTdT	1161	A-127083.1
AD-63404.1	GACGCUGGCAGAGUCCGGdTdT	828	A-127084.1	903-921	CCGGCACUCUGCCAGCUCdTdT	1162	A-127085.1
AD-63410.1	GGCAGAGUCCGGGACCGAdTdT	829	A-127086.1	909-927	UCGGUCCGGCACUCUGCCdTdT	1163	A-127087.1
AD-63416.1	ACCGACUGGCCAUGAUAdTdT	830	A-127088.1	923-941	UCAUAUAGGCCAGUCGUGdTdT	1164	A-127089.1
AD-63422.1	CCAUGUAUGAGCUGGGCCGdTdT	831	A-127090.1	932-950	CCGGCCAGCUCUAACAUUGdTdT	1165	A-127091.1
AD-63428.1	GUGGCCGGCCUUGGAGAdTdT	832	A-127092.1	943-961	UCUCCAGGGCCCGGCCAdTdT	1166	A-127093.1
AD-63387.1	CCUGGAGAAGAGGCUAdTdT	833	A-127094.1	953-971	AUGAGCCUUCUCCAGGdTdT	1167	A-127095.1
AD-63393.1	AGAAGAGGCUCAUACCUdTdT	834	A-127096.1	959-977	GAGGUGAUGAGCCUUCUdTdT	1168	A-127097.1
AD-63399.1	ACCUGGGUGAUCGGCUGAdTdT	835	A-127098.1	973-991	UGCAGCCGUACACCGAGUdTdT	1169	A-127099.1
AD-63405.1	ACGGCUGCAGCCCGAGAdTdT	836	A-127100.1	983-1001	UCCUGGGCGUCAGCCUdTdT	1170	A-127101.1
AD-63411.1	GCCGCCAGGAGCCGUGUdTdT	837	A-127102.1	992-1010	ACCACGGGUCUCCUGCGCAdTdT	1171	A-127103.1
AD-63417.1	AGCCGUGGUGGAGGUUCUdTdT	838	A-127104.1	1001-1019	AGAACCUCACCACGGCUCdTdT	1172	A-127105.1
AD-63423.1	GUGGAGGUUCUGGCGUCGdTdT	839	A-127106.1	1009-1027	CCGACGCCAGAACCUCACdTdT	1173	A-127107.1
AD-63429.1	UGGCGUCGGGGCCAUAdTdT	840	A-127108.1	1019-1037	AUGAUGGCCCGCCAGCAdTdT	1174	A-127109.1
AD-63388.1	CCAUAUGGGCUGCUGdTdT	841	A-127110.1	1031-1049	CAGACGACCCCAUGAUGdTdT	1175	A-127111.1
AD-63394.1	GCGGUCUCUGGAAGAAGdTdT	842	A-127112.1	1039-1057	CCUUCUCCAGACGACCCdTdT	1176	A-127113.1
AD-63400.1	GGAAGAAGGCCUCACAdTdT	843	A-127114.1	1049-1067	CUGUGCAGGCCUUCUCCdTdT	1177	A-127115.1
AD-63406.1	CCUGCACAGCUACGACdTdT	844	A-127116.1	1059-1077	GUCGUAUGACUGUGCAGdTdT	1178	A-127117.1
AD-63412.1	ACUACGACCCUUCGUCUdTdT	845	A-127118.1	1070-1088	AGCACGAAGGGUCGUAUdTdT	1179	A-127119.1
AD-63418.1	CCUUCGUGCUCUCCGUGAdTdT	846	A-127120.1	1079-1097	UGCACGGAGAGCACGAGdTdT	1180	A-127121.1
AD-63424.1	CCGUGCAGCCGUGGUCUdTdT	847	A-127122.1	1091-1109	AAGACCACCGCUCACGdTdT	1181	A-127123.1
AD-63430.1	CGGUGGUCUCCAGGCCUdTdT	848	A-127124.1	1100-1118	CAGGCCUGGAAGACCAGCAdTdT	1182	A-127125.1
AD-63389.1	AGGCCUGAAGUGAACCUdTdT	849	A-127126.1	1112-1130	AGGUUCACUUCACAGCCUdTdT	1183	A-127127.1
AD-63395.1	AAGUGAACCUAGCUGGAdTdT	850	A-127128.1	1121-1139	UCCAGCGUCAGGUUCACUdTdT	1184	A-127129.1
AD-63401.1	GACGCUGGACAACAGCUCdTdT	851	A-127130.1	1131-1149	GAGCCUUGUCCAGCUCdTdT	1185	A-127131.1
AD-63407.1	ACAACAGGUCGACUCCAdTdT	852	A-127132.1	1139-1157	UGGGAGUCGAGCCUUGUdTdT	1186	A-127133.1
AD-63413.1	ACUCCAGGGCGUCCUAGdTdT	853	A-127134.1	1151-1169	CUGAGGACGCCUUGGAGUdTdT	1187	A-127135.1
AD-63419.1	CCCCGUAUCUCCAGCUAdTdT	854	A-127136.1	1172-1190	UAGCUGGGGAAGUACGGGdTdT	1188	A-127137.1
AD-63425.1	UUCGCCAGCUACUCCGdTdT	855	A-127138.1	1180-1198	GCGAGUAGUAGCUGGGAAAdTdT	1189	A-127139.1
AD-63431.1	ACUACUCGCCCAAACCAAdTdT	856	A-127140.1	1190-1208	UGGGUUUGGGCGAGUAdTdT	1190	A-127141.1
AD-63437.1	CCAAACCCACUCUCUdTdT	857	A-127142.1	1199-1217	CAGGAGCAGUGGGUUUGGdTdT	1191	A-127143.1

AD-63443.1	GUCCUGGCACCUACGGUdTdT	858	A-127144.1	1211-1229	ACCGUGAGGUGCCAGGAGCdTdT	1192	A-127145.1
AD-63449.1	ACCUCACGGUGCCUCUCdTdT	859	A-127146.1	1220-1238	AGAGAGGGCACCCUGAGGUdTdT	1193	A-127147.1
AD-63455.1	CUCUCUGGACUACGGUUGdTdT	860	A-127148.1	1233-1251	CAAGCCGUAGUCCAGAGAdTdT	1194	A-127149.1
AD-63461.1	GACUACGGCUUGGCCUCdTdT	861	A-127150.1	1240-1258	AGAGGGCCAAAGCCUAGUCdTdT	1195	A-127151.1
AD-63467.1	CCCUCUGUUUGAUCCUAdTdT	862	A-127152.1	1253-1271	UAGGCAUCAAAACAGAGGdTdT	1196	A-127153.1
AD-63473.1	GUUUGAUCCUAGCACUGdTdT	863	A-127154.1	1260-1278	CAGUGCAUAGGCAUAAAdTdT	1197	A-127155.1
AD-63432.1	GCACUGAGGAGGAGAGUdTdT	864	A-127156.1	1273-1291	ACUUCUGCCUCCAGUGCdTdT	1198	A-127157.1
AD-63438.1	GGAGGAGAAUGAUUUdTdT	865	A-127158.1	1280-1298	AAAUCAUACUUCGCCUdTdT	1199	A-127159.1
AD-63444.1	AUGAUUUUGCGUGCACCCAdTdT	866	A-127160.1	1292-1310	UGGGUGCACGGCAAUAUdTdT	1200	A-127161.1
AD-63450.1	UGCACCCAGGGCCAGUGGAdTdT	867	A-127162.1	1303-1321	UCCACUGGCCUUGGUGCdTdT	1201	A-127163.1
AD-63456.1	GCCAGUGGACGAUCCAGAdTdT	868	A-127164.1	1313-1331	UUCUGGAUCGUCCAGUGCdTdT	1202	A-127165.1
AD-63462.1	GGACGAUCCAGAACAGGAdTdT	869	A-127166.1	1319-1337	CUCUGUUCUGGAUCCUdTdT	1203	A-127167.1
AD-63468.1	ACAGGAGGCGUGUGGCUdTdT	870	A-127168.1	1331-1349	AAGCCACACAGCCUCCUdTdT	1204	A-127169.1
AD-63474.1	CUGUGGCGUUGGCAUCCdTdT	871	A-127170.1	1339-1357	GGAUGCGCAAGCCACAGdTdT	1205	A-127171.1
AD-63433.1	UGCACUCCUGCAGCCUAdTdT	872	A-127172.1	1349-1367	UAGGGUGCAGGAUGCGCdTdT	1206	A-127173.1
AD-63439.1	AGCCUACGCCGAGAGAUdTdT	873	A-127174.1	1361-1379	AUCCUCUGGGUAGGGCUdTdT	1207	A-127175.1
AD-63445.1	CCGAGAGGAUCCCGUGUdTdT	874	A-127176.1	1370-1388	ACCACGGGAUCCUCCGdTdT	1208	A-127177.1
AD-63451.1	CCGUGUGGCCACGGCCGdTdT	875	A-127178.1	1382-1400	CCGGCCGUGGCCACCGdTdT	1209	A-127179.1
AD-63457.1	CCACGGCGGGAUCCAUdTdT	876	A-127180.1	1391-1409	AUGGUGAUCCCGCCUGdTdT	1210	A-127181.1
AD-63463.1	GGAUACCAUAACAUCAdTdT	877	A-127182.1	1400-1418	GUGAAGUUGAUGGUAUCCdTdT	1211	A-127183.1
AD-63469.1	UCAACUACCCUCCAGAUdTdT	878	A-127184.1	1409-1427	AUCUGGGAGGUGAAGUAdTdT	1212	A-127185.1
AD-63475.1	CCCAGAUCCUCCACGGdTdT	879	A-127186.1	1421-1439	CCGGUGAGGGAGAUCCGdTdT	1213	A-127187.1
AD-63434.1	CCCUACCGGGCCCGUGUdTdT	880	A-127188.1	1430-1448	ACACCGGGCCCGUGAGGdTdT	1214	A-127189.1
AD-63440.1	CCCGUGUGCGGGUGCACUdTdT	881	A-127190.1	1441-1459	AGUGCACCCGCACACCGdTdT	1215	A-127191.1
AD-63446.1	GCUUGUAACAACAGUCGAdTdT	882	A-127192.1	1463-1481	UCCGACUGGUUGUAACAAdTdT	1216	A-127193.1
AD-63452.1	ACAACCAGUCGGACCCUdTdT	883	A-127194.1	1469-1487	CAGGGUCCGACUGGUUdTdT	1217	A-127195.1
AD-63458.1	ACCCUCCUGGAGAGUdTdT	884	A-127196.1	1481-1499	AACUCUCCAGGCAGGGUdTdT	1218	A-127197.1
AD-63464.1	CCUGGAGAGUCCUCUGUdTdT	885	A-127198.1	1489-1507	AACAGAGGAACUCUCCAGdTdT	1219	A-127199.1
AD-63470.1	UCUGUUCUGGUAUUGGAdTdT	886	A-127200.1	1502-1520	AGUCCAUUCACAGAAAGAdTdT	1220	A-127201.1
AD-63476.1	GAAUGGACUCUGUCCUdTdT	887	A-127202.1	1512-1530	AGGGACACAGAUCCAUdTdT	1221	A-127203.1
AD-63435.1	CUGUGUCCUGCCUGUAUdTdT	888	A-127204.1	1521-1539	AUCACAGGCAGGGACAGdTdT	1222	A-127205.1
AD-63441.1	CUGCCUGUGAUGGGUCAAdTdT	889	A-127206.1	1529-1547	UUGACCCAUACAGGCAGdTdT	1223	A-127207.1
AD-63447.1	GGUCAAGGACUGCCCAAdTdT	890	A-127208.1	1542-1560	GUUGGGCAGUCCUUGACdTdT	1224	A-127209.1
AD-63453.1	UGCCCAACGGCCUGGAdTdT	891	A-127210.1	1552-1570	CAUCCAGGCCGUUGGGCdTdT	1225	A-127211.1
AD-63459.1	CGCCUGGAGAGAGAAAdTdT	892	A-127212.1	1560-1578	GUUUCUCUACUCCAGGCCdTdT	1226	A-127213.1
AD-63465.1	GAGAGAAACUGCGUUUGAdTdT	893	A-127214.1	1570-1588	UGCAAACGAGUUUCUCdTdT	1227	A-127215.1
AD-63471.1	UUUGCAGAGCCACAUCAdTdT	894	A-127216.1	1583-1601	UGGAAUGGGCUCUGCAAAdTdT	1228	A-127217.1
AD-63477.1	GCCACAUUCAGUGCAAAdTdT	895	A-127218.1	1591-1609	CUUUGCACUGGAAUGGGCdTdT	1229	A-127219.1
AD-63436.1	GUGCAAAGAGGACAGCAdTdT	896	A-127220.1	1602-1620	UGUGCUGUCCUUCUCCAdTdT	1230	A-127221.1
AD-63442.1	GAGGACAGCACAUGAUAdTdT	897	A-127222.1	1609-1627	AGAUGCAUGUGCUCCUdTdT	1231	A-127223.1
AD-63448.1	GCAUCACUGCCCAAGGUdTdT	898	A-127224.1	1622-1640	ACCUUGGGCAGUGAGUAdTdT	1232	A-127225.1
AD-63454.1	GCCCAAGGUCUGUGAGGGdTdT	899	A-127226.1	1632-1650	CCCAUCACAGACCUUGGGdTdT	1233	A-127227.1
AD-63460.1	UGUGAUGGGACCCUGAUdTdT	900	A-127228.1	1642-1660	AAUCAGGCGUCCCAUCAdTdT	1234	A-127229.1
AD-63466.1	GCAGCCUGAUUGUCUAAAdTdT	901	A-127230.1	1650-1668	GUUGAGACAUCAGGCGCdTdT	1235	A-127231.1
AD-63472.1	GUCUCAACGGCAGCAGAdTdT	902	A-127232.1	1661-1679	UCGUCGUGCCGUUGAGAdTdT	1236	A-127233.1
AD-63478.1	GCGACGAAGAGCAGUCCAdTdT	903	A-127234.1	1673-1691	UGGCACUGCUUCUGCGCdTdT	1237	A-127235.1
AD-63484.1	AGCAGUGCCAGGAAGGGUdTdT	904	A-127236.1	1682-1700	ACCCUUCUGGGCAGUCUdTdT	1238	A-127237.1
AD-63490.1	GAAGGGGUGCAUGUGGGAdTdT	905	A-127238.1	1693-1711	UCCCAUGGGACCCUUCdTdT	1239	A-127239.1
AD-63496.1	CCAUGUGGACAUCUCCUdTdT	906	A-127240.1	1702-1720	AGGUGAAUCCCAUCAGGdTdT	1240	A-127241.1
AD-63502.1	CAUUCACUCCAGUGUGAdTdT	907	A-127242.1	1712-1730	UCACACUGGAAGGUGAAUdTdT	1241	A-127243.1
AD-63508.1	CAGUGUGAGGACCGGAGCUdTdT	908	A-127244.1	1723-1741	AGCUCCGGUCCUACACUdTdT	1242	A-127245.1
AD-63514.1	GACCGGAGCUGGUGAAdTdT	909	A-127246.1	1732-1750	UCUUCAGCAGCUCGGUdTdT	1243	A-127247.1
AD-63520.1	CUGCGUGAAGAAGCCAAAdTdT	910	A-127248.1	1740-1758	GUUGGGCUUUCUACGCAdTdT	1244	A-127249.1
AD-63479.1	AGCCCAACCCGAGUGAdTdT	911	A-127250.1	1751-1769	UCACACUGCGGUUGGGCUdTdT	1245	A-127251.1
AD-63485.1	CAGUGUGAUGGGCGGCCGdTdT	912	A-127252.1	1762-1780	CGGGCCGCCAUACACUdTdT	1246	A-127253.1
AD-63491.1	GCGGCCCGACUGCAGGAdTdT	913	A-127254.1	1773-1791	GUCCUGCAGUCGGCCGdTdT	1247	A-127255.1
AD-63497.1	CUGCAGGGACGGUCGGAUdTdT	914	A-127256.1	1782-1800	AUCCGAGCCGUCCUCCAGdTdT	1248	A-127257.1
AD-63503.1	ACGGCUGGGAUGAGGAdTdT	915	A-127258.1	1790-1808	UGCUCUACUCCGAGCCUdTdT	1249	A-127259.1
AD-63509.1	UGAGGAGCACUGUGACUdTdT	916	A-127260.1	1800-1818	ACAGUCACAGUCUCCUAdTdT	1250	A-127261.1
AD-63515.1	CUGUGACUGGGCCUCCAGdTdT	917	A-127262.1	1809-1827	CUGGAGGCCACAGUCAGdTdT	1251	A-127263.1

AD-63521.1	GCCUCCAGGGCCCUCCAGdTdT	918	A-127264.1	1820-1838	CUGGAGGGCCUUGAGGGdTdT	1252	A-127265.1
AD-63480.1	CCCCUCCAGCCGCAUUGUdTdT	919	A-127266.1	1830-1848	AACAUGCGGCUUGAGGGdTdT	1253	A-127267.1
AD-63486.1	CCGCAUUGUUGGUGGAGCAdTdT	920	A-127268.1	1839-1857	AGCUCCACCAACAUGCGGdTdT	1254	A-127269.1
AD-63492.1	GUGGAGCUGUGUCCUCCAdTdT	921	A-127270.1	1850-1868	UCGGAGGACACAGCUCCAdTdT	1255	A-127271.1
AD-63498.1	CUCCGAGGGUGAGUGGCCAdTdT	922	A-127272.1	1863-1881	UGGCCACUACCCUCGGAdTdT	1256	A-127273.1
AD-63504.1	GGUGAGUGGCCAUGGCAdTdT	923	A-127274.1	1869-1887	CUGCCAUGGCCACUACCCdTdT	1257	A-127275.1
AD-63510.1	AUGGCAGGCCAGCCUCCAdTdT	924	A-127276.1	1881-1899	CUGGAGGCUUGGCCUCCAdTdT	1258	A-127277.1
AD-63516.1	CCUCCAGGUUCGGGUGCAdTdT	925	A-127278.1	1893-1911	UCGACCCGAACCUUGAGGdTdT	1259	A-127279.1
AD-63522.1	GGUUCGGGUGGACACAdTdT	926	A-127280.1	1899-1917	GAUGUGUCGACCCGAACTdTdT	1260	A-127281.1
AD-63481.1	ACAUCUGUGGGGGGCCUdTdT	927	A-127282.1	1913-1931	AGGGCCCCCACAUGUdTdT	1261	A-127283.1
AD-63487.1	GUGGGGGGCCUUCGAdTdT	928	A-127284.1	1919-1937	GCGAUGAGGGCCCCCAdTdT	1262	A-127285.1
AD-63493.1	AUCGUGACCGUGGGUGAdTdT	929	A-127286.1	1933-1951	UCACCCAGCGGUCAGCGAdTdT	1263	A-127287.1
AD-63499.1	ACCGUGGGUGAUAAACGAdTdT	930	A-127288.1	1940-1958	GCUGUUAUCACCCAGCGGdTdT	1264	A-127289.1
AD-63505.1	UGAUAAACAGCUGCCACUdTdT	931	A-127290.1	1949-1967	CAGUGGGCAGUGUUAUCAdTdT	1265	A-127291.1
AD-63511.1	CCCACUGUUCACAGGAGdTdT	932	A-127292.1	1961-1979	UCCUCUGGAAGCAGUGGGdTdT	1266	A-127293.1
AD-63517.1	CCAGGAGGACAGCAUGGCCdTdT	933	A-127294.1	1971-1989	GGCCAUGCUGUCCUUGGdTdT	1267	A-127295.1
AD-63523.1	ACAGCAUGGCCUCCAGGdTdT	934	A-127296.1	1979-1997	ACCGUGGAGGCCAUGCUGdTdT	1268	A-127297.1
AD-63482.1	CCACGGUGCUGUGACCGdTdT	935	A-127298.1	1991-2009	ACGGUCCACAGCACCGUGdTdT	1269	A-127299.1
AD-63488.1	GGACCGUGUCCUGGGCAAdTdT	936	A-127300.1	2003-2021	UUGCCAGGAACACGUGCCdTdT	1270	A-127301.1
AD-63494.1	UCCUGGGCAAGGUGGCAAdTdT	937	A-127302.1	2012-2030	UGCCACACCUUGCCAGGAdTdT	1271	A-127303.1
AD-63500.1	GUGUGGCAGAACUCGCGUdTdT	938	A-127304.1	2023-2041	AGCGGAGUUCUGCCACAdTdT	1272	A-127305.1
AD-63506.1	GAACUCGCGUGGCCUGAdTdT	939	A-127306.1	2031-2049	UCCAGGCCAGCGGAGUUCdTdT	1273	A-127307.1
AD-63512.1	GGCCUGGAGAGGUGUCCUdTdT	940	A-127308.1	2042-2060	AAGGACACCUCCAGGCCdTdT	1274	A-127309.1
AD-63518.1	AGGUGUCCUUAAGGUGAdTdT	941	A-127310.1	2051-2069	CUCACCUUGAAGGACACCUdTdT	1275	A-127311.1
AD-63524.1	CAAGGUGAGGCCGCCUCdTdT	942	A-127312.1	2061-2079	GAGCAGGGCGGCUACCUUGdTdT	1276	A-127313.1
AD-63483.1	GCCUGUCCUGCACCCGAdTdT	943	A-127314.1	2072-2090	UACGGGUGCAGGAGCAGGdTdT	1277	A-127315.1
AD-63489.1	GCACCCGUACCAGAGAdTdT	944	A-127316.1	2082-2100	CUCUUCGUGGUACGGGUGdTdT	1278	A-127317.1
AD-63495.1	CCACGAAGAGACAGCAUdTdT	945	A-127318.1	2091-2109	AUGGCUUGCCUUCUGUGdTdT	1279	A-127319.1
AD-63501.1	AGGACAGCCAUACGAdTdT	946	A-127320.1	2099-2117	UCGUAGUCAUGGCUUGdTdT	1280	A-127321.1
AD-63507.1	ACUACAGCUGGGCGUCUdTdT	947	A-127322.1	2111-2129	AGCAGGCCACGUCGUAdTdT	1281	A-127323.1
AD-63513.1	UGGCGUCUGCAGCUCAdTdT	948	A-127324.1	2120-2138	UCGAGCUGCAGCAGCCAdTdT	1282	A-127325.1
AD-63519.1	AGCUCAGCACCCGGUGGdTdT	949	A-127326.1	2132-2150	ACCACCGGGUGGUCAGCAdTdT	1283	A-127327.1
AD-63525.1	CCGGUGGUGCGCUGGCCdTdT	950	A-127328.1	2143-2161	CGGCCGAGCGCACCCGGdTdT	1284	A-127329.1
AD-63531.1	UGCGUCUGGCCCGCGUGGdTdT	951	A-127330.1	2150-2168	CGCACGGCGCCGAGCGAdTdT	1285	A-127331.1
AD-63537.1	CCGUGGCCCGGUCUCCUdTdT	952	A-127332.1	2162-2180	AGGCAGAGGGGCGCAGGdTdT	1286	A-127333.1
AD-63543.1	CCGUCUGCCUCCCGCGGdTdT	953	A-127334.1	2171-2189	CGCGGGGCGAGGACAGGdTdT	1287	A-127335.1
AD-63549.1	CCGCGCGUCCACUUCUdTdT	954	A-127336.1	2183-2201	AAGAAGUGGAGCGCGGdTdT	1288	A-127337.1
AD-63555.1	CCCACUUCUUGAGCCCGdTdT	955	A-127338.1	2192-2210	CCGGGUCGAAGAAGUGGdTdT	1289	A-127339.1
AD-63561.1	GAGCCCGCCUGCAGCUCdTdT	956	A-127340.1	2203-2221	AGCAGUGCAGGCCGGCUCdTdT	1290	A-127341.1
AD-63567.1	GGCCUGCAGUCUGGAUAdTdT	957	A-127342.1	2209-2227	UAAUCCAGCAGUGCAGGdTdT	1291	A-127343.1
AD-63526.1	UGGAUACGGGUGGGGCGdTdT	958	A-127344.1	2221-2239	CGCCCAGCCCGUUAUCCAdTdT	1292	A-127345.1
AD-63532.1	GCUGGGGCGCCUUGCGGAdTdT	959	A-127346.1	2231-2249	UCGCGCAAGCGCCCGCAdTdT	1293	A-127347.1
AD-63538.1	UGCGGAGGGCGGCCUAdTdT	960	A-127348.1	2243-2261	AUGGGCGCCCGCCUCCAdTdT	1294	A-127349.1
AD-63544.1	AGGGCGGCCCAUCAGAAAdTdT	961	A-127350.1	2249-2267	UUGCUGAUGGGGCCCCUdTdT	1295	A-127351.1
AD-63550.1	UCAGCAACGUCUCAGAAAdTdT	962	A-127352.1	2261-2279	UUCUGCAGAGCGUUGCUGAdTdT	1296	A-127353.1
AD-63556.1	UGCAGAAAGUGGAUGCAdTdT	963	A-127354.1	2273-2291	UGCACAUCCAUUCUGCAdTdT	1297	A-127355.1
AD-63562.1	AAGUGGAUGUGCAGUUGAdTdT	964	A-127356.1	2279-2297	AUCAACUGCACAUCCAUdTdT	1298	A-127357.1
AD-63568.1	GCAGUUGAUCCACAGGAdTdT	965	A-127358.1	2289-2307	GUCCUGGGUAACAUCGdTdT	1299	A-127359.1
AD-63527.1	CACAGGACCUUGCAGGAdTdT	966	A-127360.1	2300-2318	UCGUCGACAGGUCCUGGdTdT	1300	A-127361.1
AD-63533.1	GCAGCGAGGUCUACGCUAdTdT	967	A-127362.1	2312-2330	UAGCGAUAGACCUUCGUCdTdT	1301	A-127363.1
AD-63539.1	GUCUAUCGUAACCGGAdTdT	968	A-127364.1	2320-2338	UCACCUUGUAGCGAUAGAdTdT	1302	A-127365.1
AD-63545.1	CCAGGUGACGCCAGCAUGdTdT	969	A-127366.1	2331-2349	CAUGCGUGGGCGACCUGdTdT	1303	A-127367.1
AD-63551.1	CCACGCAUGCUGUGCCGdTdT	970	A-127368.1	2341-2359	CGGCACAGCAUGCGUGdTdT	1304	A-127369.1
AD-63557.1	CUGUGUGCCGGUACCCAdTdT	971	A-127370.1	2350-2368	UGCGGUAGCCGGCACAGdTdT	1305	A-127371.1
AD-63563.1	ACCGCAAGGGCAAGAGAdTdT	972	A-127372.1	2363-2381	UCCUUCUUGCCUUGCGGdTdT	1306	A-127373.1
AD-63569.1	GCAAGAAGGUAUGGUCAdTdT	973	A-127374.1	2372-2390	UGACAGGCAUCCUUCUGdTdT	1307	A-127375.1
AD-63528.1	GCCUGACAGGGUGACUAdTdT	974	A-127376.1	2383-2401	CUGAGUACCCUGACAGGdTdT	1308	A-127377.1
AD-63534.1	GUGACUCAGGUGGUCGAdTdT	975	A-127378.1	2393-2411	AGCGGACCACUAGUACAdTdT	1309	A-127379.1
AD-63540.1	GUGGUCCGUGGUGCAAAdTdT	976	A-127380.1	2402-2420	UUGCACACAGCGACCAAdTdT	1310	A-127381.1
AD-63546.1	UGGUGUGCAAGGCACUAdTdT	977	A-127382.1	2411-2429	CUGAGUGCCUUGCACCAAdTdT	1311	A-127383.1

AD-63552.1	GCACUCAGUGCCGCGUGdTdT	978	A-127384.1	2422-2440	ACCAGCGCCACUGAGUCdTdT	1312	A-127385.1
AD-63558.1	GCCGUGGUUCCUGGGGdTdT	979	A-127386.1	2432-2450	CCCGCAGGAACCGCGCdTdT	1313	A-127387.1
AD-63564.1	UCCUGGGGGGUGGUCAGdTdT	980	A-127388.1	2441-2459	CUGACCAGCCCGCAGGAdTdT	1314	A-127389.1
AD-63570.1	GCUGGUCAGCUGGGCCUGdTdT	981	A-127390.1	2451-2469	CAGGCCCCAGCUGACCAGdTdT	1315	A-127391.1
AD-63529.1	GGGCCUGGUGUGGGCCGdTdT	982	A-127392.1	2463-2481	CCGGCCACAGCCAGGCCdTdT	1316	A-127393.1
AD-63535.1	GGCUGUGGGCCGCUAACdTdT	983	A-127394.1	2470-2488	AGUUAGGGCCACAGCCdTdT	1317	A-127395.1
AD-63541.1	CUAACUACUCCGGUCAdTdT	984	A-127396.1	2483-2501	UAGACGCCAAGUAGUAGdTdT	1318	A-127397.1
AD-63547.1	CGGCGUCUACACCCGCAUdTdT	985	A-127398.1	2493-2511	GAUGGGGUGUAGACGCCdTdT	1319	A-127399.1
AD-63553.1	ACACCCGCAUCACAGGUGdTdT	986	A-127400.1	2501-2519	ACACCUUGAUGCGGGUGdTdT	1320	A-127401.1
AD-63559.1	ACAGGUGUGAUCAGCUGGAdTdT	987	A-127402.1	2512-2530	UCCAGCUGAUCACACCUUGdTdT	1321	A-127403.1
AD-63565.1	UCAGCUGGAUCAGCAAGUdTdT	988	A-127404.1	2522-2540	ACUUGGUGGAUCAGCUGAdTdT	1322	A-127405.1
AD-63571.1	CAGCAAGUGGUGACCUAGdTdT	989	A-127406.1	2533-2551	CUCAGGUCACCACUUGCUGdTdT	1323	A-127407.1
AD-63530.1	UGACCUAGGAAUCUGCCdTdT	990	A-127408.1	2543-2561	GGGGCAGUUCUCAGGUCAdTdT	1324	A-127409.1
AD-63536.1	GGAACUGCCCCUCGAAAdTdT	991	A-127410.1	2551-2569	UUUGCAGGGGGCAGUUCdTdT	1325	A-127411.1
AD-63542.1	CUGCAAAGCAGGGCCACdTdT	992	A-127412.1	2563-2581	GGUGGGCCUGCUUUGCAGdTdT	1326	A-127413.1
AD-63548.1	GCAGGGCCACCUUCUGGAdTdT	993	A-127414.1	2570-2588	UCCAGGAGGUGGGCCUGCdTdT	1327	A-127415.1
AD-63554.1	CCUCCUGGACUCAGAGAGdTdT	994	A-127416.1	2580-2598	GCUCUCUGAUGCAGGAGdTdT	1328	A-127417.1
AD-63560.1	CUCAGAGACCCAGGGCAAdTdT	995	A-127418.1	2589-2607	UUGCCUGGGCUCUCUGAGdTdT	1329	A-127419.1
AD-63566.1	CCAGGGCAUCGCCAAGCAdTdT	996	A-127420.1	2599-2617	UGCUUGGAGUUGCCUGGdTdT	1330	A-127421.1
AD-63572.1	GGACAAGUUAUCUGGGGdTdT	997	A-127422.1	2621-2639	CCCGCAGAAUACUUGCCdTdT	1331	A-127423.1
AD-63578.1	CUGGGGGGGGUGGGGAGdTdT	998	A-127424.1	2632-2650	CUCCCCCCCCCCGCAGdTdT	1332	A-127425.1
AD-63584.1	GGGUGGGGGAGAGAGCAGdTdT	999	A-127426.1	2640-2658	CCUGCUCUCUCCCCACCCdTdT	1333	A-127427.1
AD-63590.1	AGAGAGCAGGCCUCUGGdTdT	1000	A-127428.1	2649-2667	ACCACAGGGCCUGCUCUdTdT	1334	A-127429.1
AD-63596.1	CCCUUGGUGGCAAGGAGUdTdT	1001	A-127430.1	2659-2677	ACCUCCUGCCACACAGGGdTdT	1335	A-127431.1
AD-63602.1	GGAGGUGGCAUCUUGUCdTdT	1002	A-127432.1	2672-2690	GAGACAAGAUCCACCUdTdT	1336	A-127433.1
AD-63608.1	CAUCUUGUCUCGUCCUGAdTdT	1003	A-127434.1	2680-2698	UCAGGGACGAGACAAGUdTdT	1337	A-127435.1
AD-63614.1	CCCUAGUUCUCUCCAGUdTdT	1004	A-127436.1	2693-2711	ACUGGAGCAGACAUCAGGdTdT	1338	A-127437.1
AD-63573.1	CUGCUCCAGUAGUGCAGGdTdT	1005	A-127438.1	2702-2720	CCUGCAUCACUGGAGCAGdTdT	1339	A-127439.1
AD-63579.1	AUGGCAGGAGGAUGGAAAdTdT	1006	A-127440.1	2713-2731	UUCUCAUCUCCUUGCCAAdTdT	1340	A-127441.1
AD-63585.1	GGAUGGAGAAGUGCCAGAdTdT	1007	A-127442.1	2722-2740	UGCUGGCACUUCUCAUCCdTdT	1341	A-127443.1
AD-63591.1	UGCCAGCAGCUGGGGUCAdTdT	1008	A-127444.1	2733-2751	UGACCCCCAGCUGCGGAdTdT	1342	A-127445.1
AD-63597.1	AGCUGGGGUCUAGAGCUGdTdT	1009	A-127446.1	2740-2758	GACGUCUUGACCCAGCUGdTdT	1343	A-127447.1
AD-63603.1	UCAAGACGUCCUUGAGAdTdT	1010	A-127448.1	2749-2767	UCCUCAGGGGACGCUUAGdTdT	1344	A-127449.1
AD-63609.1	CCCUAGGACCCAGGCCAdTdT	1011	A-127450.1	2759-2777	UGGGCCUGGGUCCUCAGGdTdT	1345	A-127451.1
AD-63615.1	GCCCCACCCAGCCUUCdTdT	1012	A-127452.1	2773-2791	AGAAGGGCUGGGUGUGGdTdT	1346	A-127453.1
AD-63574.1	AGCCUUCUGCCUCCAAUdTdT	1013	A-127454.1	2783-2801	AUUGGGAGGCAGAAAGGdTdT	1347	A-127455.1
AD-63580.1	CCUCCAAUUCUCUCCUdTdT	1014	A-127456.1	2793-2811	AGGAGAGAAUUGGAGGdTdT	1348	A-127457.1
AD-63586.1	CUCUCUCCUGUCCCUdTdT	1015	A-127458.1	2803-2821	AAGGGGACGGAGAGAGdTdT	1349	A-127459.1
AD-63592.1	UCCGUCCCUUCCUCCAdTdT	1016	A-127460.1	2811-2829	AGUGGAGGAAGGGGACGAdTdT	1350	A-127461.1
AD-63598.1	CUUCCUCCACUGCGCCUdTdT	1017	A-127462.1	2819-2837	UAGGCAGCAGUGGAGGAAdTdT	1351	A-127463.1
AD-63604.1	CUGCCUAAUGCAAGCAGUdTdT	1018	A-127464.1	2831-2849	ACUGCCUUGCAUUGGAGdTdT	1352	A-127465.1
AD-63610.1	GCAAGGCAGUGGUCAGAdTdT	1019	A-127466.1	2840-2858	UGCUGAGCCACUGCCUUGCdTdT	1353	A-127467.1
AD-63616.1	UGGCUACAGCAAGAAUdTdT	1020	A-127468.1	2849-2867	CAUUCUUGCUGCAGCAdTdT	1354	A-127469.1
AD-63575.1	CAAGAAUCUGGUUUCAdTdT	1021	A-127470.1	2860-2878	UGUAGAACCAGCAUUCUdTdT	1355	A-127471.1
AD-63581.1	UGGUUCUACAUCCGAGAdTdT	1022	A-127472.1	2869-2887	UCCUGGGAGUAGAACAdTdT	1356	A-127473.1
AD-63587.1	CCCGAGGAGUGUCUGAGGdTdT	1023	A-127474.1	2880-2898	ACCUACAGACAUCCUGGdTdT	1357	A-127475.1
AD-63593.1	GUCUGAGGUGCGCCACUdTdT	1024	A-127476.1	2890-2908	AGUGGGGCGCACUCAGAdTdT	1358	A-127477.1
AD-63599.1	GCCCCACUCUGACAGGdTdT	1025	A-127478.1	2901-2919	CCUCUGUACAGAGUGGGdTdT	1359	A-127479.1
AD-63605.1	CUGUACAGAGGUCUUGGdTdT	1026	A-127480.1	2909-2927	CCAAACAGCCUCUGUACAdTdT	1360	A-127481.1
AD-63611.1	CUGUUUGGGCAGCCUUGCCdTdT	1027	A-127482.1	2920-2938	GGCAAGGUCGCCAAACAdTdT	1361	A-127483.1
AD-63617.1	CUUGCCUCCAGAGAGAdTdT	1028	A-127484.1	2933-2951	UCUGCUCUCUGGAGGCAAdTdT	1362	A-127485.1
AD-63576.1	UCCAGAGAGCAGAUCCAGdTdT	1029	A-127486.1	2939-2957	CUGGAAUCUGCUCUGGAdTdT	1363	A-127487.1
AD-63582.1	GAUUCAGCUCUGGAAGCCdTdT	1030	A-127488.1	2950-2968	GGCUUCCGAAAGCUGGAUdTdT	1364	A-127489.1
AD-63588.1	GAAUGGAAGGUGCUCCAUdTdT	1031	A-127490.1	2991-3009	AUGGGAGCACCUCCAUdTdT	1365	A-127491.1
AD-63594.1	GUGCUCCAUCCGAGGGAdTdT	1032	A-127492.1	3000-3018	UCCCUCCGAGUGGAGCAdTdT	1366	A-127493.1
AD-63600.1	UCGAGGGGACCCUCAGAdTdT	1033	A-127494.1	3009-3027	CUCUGAGGGUCCCUCCAdTdT	1367	A-127495.1
AD-63606.1	CCCUACAGACCCUGAGAdTdT	1034	A-127496.1	3019-3037	GUCUCACAGGUCUGAGGdTdT	1368	A-127497.1
AD-63612.1	GAGACUGCCAGGUGGGCCUdTdT	1035	A-127498.1	3033-3051	AGGCCACCUCCAGCUCdTdT	1369	A-127499.1
AD-63618.1	AGGUGGGCUCUGCCACUdTdT	1036	A-127500.1	3042-3060	AGUGGCAGCAGGCCACCUdTdT	1370	A-127501.1
AD-63577.1	CUGCCACUGUAGCCAAAdTdT	1037	A-127502.1	3053-3071	UUUUGGCUUACAGUGGCAAdTdT	1371	A-127503.1

042137

AD-63583.1	CUGUAAGCCAAAAGGUGGGdTdT	1038	A-127504.1	3059-3077	CCCACUUUUUGGCUUACAGdTdT	1372	A-127505.1
AD-63589.1	GUGGGGAAGUCCUGACUCdTdT	1039	A-127506.1	3073-3091	GGAGUCAGGACUCCCCACdTdT	1373	A-127507.1
AD-63595.1	CCUGACUCCAGGGUCCUUGdTdT	1040	A-127508.1	3083-3101	CAAGGACCCUGGAGUCAGGdTdT	1374	A-127509.1
AD-63601.1	GGGUCCUUGCCCCACCCUdTdT	1041	A-127510.1	3093-3111	AGGGGUGGGCAAGGACCCdTdT	1375	A-127511.1
AD-63607.1	GCCCCACCCUGCCUGCCAdTdT	1042	A-127512.1	3101-3119	UGGCAGGCAGGGUGGGCCdTdT	1376	A-127513.1
AD-63613.1	CCUGCCACCUAGGGCCUCAdTdT	1043	A-127514.1	3113-3131	UGAGGGCCAGGUGGCAGdTdT	1377	A-127515.1
AD-63619.1	CUGGGCCUCACAGCCAGdTdT	1044	A-127516.1	3121-3139	CUGGGCUGAGGGCCAGdTdT	1378	A-127517.1
AD-63620.1	UCACAGCCAGACCCUCAdTdT	1045	A-127518.1	3129-3147	GUGAGGGUCUGGGCUGAdTdT	1379	A-127519.1
AD-63621.1	CUCACUGGGAGGUGAGCUCdTdT	1046	A-127520.1	3143-3161	GAGCUCACCCUCCAGUGAdTdT	1380	A-127521.1
AD-63622.1	GGUGAGCUCAGCUGCCUUdTdT	1047	A-127522.1	3153-3171	AAGGGCAGCUGAGCUCACdTdT	1381	A-127523.1
AD-63623.1	UGGAUAUAAAGCUGCCUGAUdTdT	1048	A-127524.1	3172-3190	AUCAGGCAGCUUUAUCCAdTdT	1382	A-127525.1

Таблица 13

Тест разовой дозы TMPRSS6 (10 нМ) в клетках Hep3B с siRNA с модифицированным dT

ID дуплекса	Средн. % оставшегося количества транскрипта	SD
AD-63290.1	122,8	18,0
AD-63296.1	87,4	6,0
AD-63302.1	71,4	16,9
AD-63308.1	82,1	10,3
AD-63314.1	59,1	5,3
AD-63320.1	90,7	4,5
AD-63326.1	121,0	18,2
AD-63332.1	114,4	11,6
AD-63291.1	84,7	15,0
AD-63297.1	82,8	3,9
AD-63303.1	67,6	5,5
AD-63309.1	55,8	6,5
AD-63315.1	64,2	7,4
AD-63321.1	85,8	6,4
AD-63327.1	91,9	14,9
AD-63333.1	76,4	5,2
AD-63292.1	54,4	22,9
AD-63298.1	54,6	5,0
AD-63304.1	24,6	7,3
AD-63310.1	23,3	0,6
AD-63316.1	50,9	7,2
AD-63322.1	53,7	10,5
AD-63328.1	29,2	2,3
AD-63334.1	28,5	1,2
AD-63293.1	50,9	6,8
AD-63299.1	85,5	2,3
AD-63305.1	43,0	7,2
AD-63311.1	28,9	2,6
AD-63317.1	40,9	2,7
AD-63323.1	40,2	7,3
AD-63329.1	27,9	12,0
AD-63335.1	82,0	4,2
AD-63294.1	21,8	1,0
AD-63300.1	32,3	8,0
AD-63306.1	32,9	8,3
AD-63312.1	26,5	4,6
AD-63318.1	31,3	2,4
AD-63324.1	25,7	1,9
AD-63330.1	24,5	2,0

042137

AD-63336.1	36,1	8,6
AD-63295.1	29,2	1,8
AD-63301.1	28,9	5,2
AD-63307.1	68,8	10,6
AD-63313.1	90,2	8,2
AD-63319.1	21,9	3,3
AD-63325.1	26,1	4,8
AD-63331.1	36,7	4,5
AD-63337.1	67,7	9,3
AD-63343.1	83,9	15,0
AD-63349.1	71,6	3,5
AD-63355.1	62,8	10,4
AD-63361.1	56,0	3,3
AD-63367.1	49,3	8,7
AD-63373.1	54,1	8,2
AD-63379.1	47,5	6,3
AD-63338.1	28,0	2,8
AD-63344.1	29,7	5,7
AD-63350.1	23,0	2,3
AD-63356.1	81,5	13,7
AD-63362.1	19,7	2,9
AD-63368.1	42,2	4,7
AD-63374.1	24,5	2,0
AD-63380.1	24,9	4,9
AD-63339.1	28,9	10,1
AD-63345.1	29,9	5,6
AD-63351.1	20,4	3,7
AD-63357.1	35,8	6,8
AD-63363.1	30,4	2,5
AD-63369.1	29,0	3,1
AD-63375.1	36,6	2,4
AD-63381.1	29,1	4,3
AD-63340.1	40,4	18,8
AD-63346.1	36,4	3,5
AD-63352.1	25,8	3,9
AD-63358.1	42,6	8,1
AD-63364.1	48,1	6,6
AD-63370.1	24,6	2,8
AD-63376.1	22,1	4,2
AD-63382.1	31,0	7,5
AD-63341.1	37,6	13,7
AD-63347.1	27,6	2,0
AD-63353.1	76,4	14,5
AD-63359.1	25,3	1,1
AD-63365.1	27,3	3,4
AD-63371.1	16,3	1,3

042137

AD-63377.1	65,4	7,1
AD-63383.1	72,2	7,0
AD-63342.1	30,8	7,3
AD-63348.1	72,7	9,2
AD-63354.1	38,7	5,0
AD-63360.1	28,7	3,0
AD-63366.1	30,9	6,8
AD-63372.1	84,0	9,0
AD-63378.1	64,1	8,6
AD-63384.1	38,0	2,6
AD-63390.1	48,3	10,6
AD-63396.1	45,6	7,0
AD-63402.1	42,0	9,9
AD-63408.1	40,4	9,1
AD-63414.1	23,8	6,2
AD-63420.1	55,3	5,2
AD-63426.1	61,6	8,5
AD-63385.1	61,6	10,2
AD-63391.1	38,0	3,1
AD-63397.1	66,7	16,8
AD-63403.1	77,2	15,4
AD-63409.1	60,3	10,7
AD-63415.1	35,0	5,4
AD-63421.1	60,6	2,9
AD-63427.1	40,5	7,2
AD-63386.1	42,0	7,4
AD-63392.1	34,2	3,1
AD-63398.1	62,6	18,5
AD-63404.1	65,9	8,1
AD-63410.1	19,7	4,0
AD-63416.1	51,3	9,0
AD-63422.1	59,3	2,7
AD-63428.1	58,2	9,7
AD-63387.1	42,2	4,8
AD-63393.1	27,9	4,4
AD-63399.1	49,6	8,4
AD-63405.1	72,5	9,3
AD-63411.1	45,4	14,9
AD-63417.1	36,7	9,4
AD-63423.1	76,8	4,9
AD-63429.1	77,8	14,4
AD-63388.1	37,4	4,4
AD-63394.1	31,5	4,6
AD-63400.1	60,9	28,6
AD-63406.1	40,7	14,3
AD-63412.1	22,0	7,0

042137

AD-63418.1	22,8	4,3
AD-63424.1	25,5	2,8
AD-63430.1	21,5	3,2
AD-63389.1	34,4	5,3
AD-63395.1	31,1	0,7
AD-63401.1	44,3	9,5
AD-63407.1	41,5	4,9
AD-63413.1	52,4	6,4
AD-63419.1	26,3	5,6
AD-63425.1	78,8	4,6
AD-63431.1	32,8	6,6
AD-63437.1	42,3	1,4
AD-63443.1	56,4	8,9
AD-63449.1	26,0	5,9
AD-63455.1	28,0	9,7
AD-63461.1	32,1	11,1
AD-63467.1	33,8	19,8
AD-63473.1	28,9	3,4
AD-63432.1	36,5	7,4
AD-63438.1	27,3	4,3
AD-63444.1	54,6	36,0
AD-63450.1	42,0	6,1
AD-63456.1	36,6	10,2
AD-63462.1	23,3	3,0
AD-63468.1	48,8	27,3
AD-63474.1	23,8	3,2
AD-63433.1	51,8	13,8
AD-63439.1	41,7	5,5
AD-63445.1	74,6	6,1
AD-63451.1	49,6	9,0
AD-63457.1	26,7	4,9
AD-63463.1	27,8	3,8
AD-63469.1	48,4	14,0
AD-63475.1	40,3	1,4
AD-63434.1	93,3	9,9
AD-63440.1	37,6	4,7
AD-63446.1	38,1	15,4
AD-63452.1	42,3	4,0
AD-63458.1	29,7	7,9
AD-63464.1	25,7	3,4
AD-63470.1	44,8	7,8
AD-63476.1	33,9	4,7
AD-63435.1	23,4	5,2
AD-63441.1	37,1	4,5
AD-63447.1	46,5	9,0
AD-63453.1	73,1	16,8

042137

AD-63459.1	31,8	4,6
AD-63465.1	27,3	6,6
AD-63471.1	19,5	3,1
AD-63477.1	35,2	4,7
AD-63436.1	21,8	4,7
AD-63442.1	44,1	11,2
AD-63448.1	33,6	6,0
AD-63454.1	58,2	16,8
AD-63460.1	27,7	2,4
AD-63466.1	27,1	4,4
AD-63472.1	20,5	4,1
AD-63478.1	36,3	7,3
AD-63484.1	48,4	31,3
AD-63490.1	44,0	6,1
AD-63496.1	45,5	19,9
AD-63502.1	49,0	18,3
AD-63508.1	41,4	2,7
AD-63514.1	36,0	5,1
AD-63520.1	40,9	4,2
AD-63479.1	35,1	6,5
AD-63485.1	45,5	24,0
AD-63491.1	69,0	14,5
AD-63497.1	57,1	25,1
AD-63503.1	36,0	15,3
AD-63509.1	29,7	6,4
AD-63515.1	33,9	5,7
AD-63521.1	117,2	10,2
AD-63480.1	38,6	0,7
AD-63486.1	48,5	12,1
AD-63492.1	38,7	3,7
AD-63498.1	64,6	20,3
AD-63504.1	41,7	1,9
AD-63510.1	39,6	4,0
AD-63516.1	30,9	4,8
AD-63522.1	56,4	15,6
AD-63481.1	72,0	7,3
AD-63487.1	128,8	48,9
AD-63493.1	31,7	6,7
AD-63499.1	44,2	17,7
AD-63505.1	69,4	7,6
AD-63511.1	43,8	5,3
AD-63517.1	75,3	2,2
AD-63523.1	82,1	10,6
AD-63482.1	40,1	12,2
AD-63488.1	42,3	12,7
AD-63494.1	19,0	1,1

042137

AD-63500.1	30,2	11,2
AD-63506.1	30,5	7,6
AD-63512.1	38,1	15,2
AD-63518.1	35,0	7,3
AD-63524.1	60,5	3,7
AD-63483.1	22,7	3,6
AD-63489.1	47,6	13,7
AD-63495.1	31,0	12,7
AD-63501.1	24,3	2,1
AD-63507.1	37,4	7,0
AD-63513.1	32,3	5,1
AD-63519.1	46,0	6,6
AD-63525.1	66,5	14,5
AD-63531.1	104,0	24,1
AD-63537.1	32,1	3,4
AD-63543.1	31,2	3,8
AD-63549.1	35,2	5,2
AD-63555.1	41,7	9,3
AD-63561.1	44,2	7,0
AD-63567.1	39,2	4,9
AD-63526.1	66,9	15,7
AD-63532.1	90,3	17,8
AD-63538.1	50,8	11,5
AD-63544.1	31,9	2,4
AD-63550.1	35,0	8,8
AD-63556.1	31,0	6,0
AD-63562.1	20,2	2,4
AD-63568.1	30,6	2,7
AD-63527.1	28,8	2,4
AD-63533.1	63,3	6,9
AD-63539.1	28,4	3,5
AD-63545.1	26,9	8,5
AD-63551.1	52,5	4,7
AD-63557.1	26,7	2,2
AD-63563.1	28,1	2,7
AD-63569.1	29,2	2,8
AD-63528.1	52,9	9,0
AD-63534.1	42,5	6,8
AD-63540.1	50,5	10,9
AD-63546.1	53,6	10,5
AD-63552.1	38,8	5,0
AD-63558.1	49,3	3,0
AD-63564.1	69,2	3,1
AD-63570.1	50,6	6,0
AD-63529.1	59,5	6,5
AD-63535.1	21,0	1,7

042137

AD-63541.1	40,1	23,4
AD-63547.1	26,0	9,6
AD-63553.1	31,5	6,0
AD-63559.1	34,9	2,7
AD-63565.1	43,3	5,3
AD-63571.1	41,6	4,4
AD-63530.1	127,6	15,0
AD-63536.1	38,0	16,0
AD-63542.1	48,3	8,4
AD-63548.1	41,9	7,9
AD-63554.1	88,2	15,2
AD-63560.1	48,8	17,7
AD-63566.1	33,6	6,8
AD-63572.1	82,4	67,9
AD-63578.1	78,5	11,5
AD-63584.1	55,7	7,2
AD-63590.1	53,4	2,9
AD-63596.1	63,5	8,6
AD-63602.1	49,3	3,6
AD-63608.1	29,2	4,4
AD-63614.1	30,0	7,4
AD-63573.1	96,1	14,7
AD-63579.1	38,1	4,5
AD-63585.1	40,0	2,1
AD-63591.1	30,5	2,5
AD-63597.1	55,1	5,8
AD-63603.1	43,6	4,0
AD-63609.1	37,7	2,7
AD-63615.1	44,4	9,7
AD-63574.1	44,3	10,3
AD-63580.1	33,1	3,5
AD-63586.1	39,3	2,9
AD-63592.1	73,7	1,6
AD-63598.1	32,4	6,6
AD-63604.1	98,7	7,1
AD-63610.1	42,1	7,1
AD-63616.1	55,2	10,4
AD-63575.1	27,8	3,0
AD-63581.1	36,3	3,2
AD-63587.1	36,1	3,3
AD-63593.1	39,2	4,7
AD-63599.1	37,0	5,6
AD-63605.1	49,3	3,7
AD-63611.1	88,8	7,7
AD-63617.1	45,6	6,6
AD-63576.1	59,9	2,9

AD-63582.1	82,9	8,3
AD-63588.1	33,5	6,7
AD-63594.1	64,7	18,0
AD-63600.1	99,5	11,9
AD-63606.1	40,8	2,7
AD-63612.1	44,5	5,3
AD-63618.1	41,7	4,6
AD-63577.1	31,1	0,3
AD-63583.1	57,3	8,6
AD-63589.1	61,9	5,9
AD-63595.1	51,2	8,5
AD-63601.1	70,7	15,4
AD-63607.1	39,4	1,9
AD-63613.1	36,8	2,7
AD-63619.1	83,8	13,8
AD-63620.1	69,4	7,3
AD-63621.1	30,6	3,1
AD-63622.1	51,8	8,4
AD-63623.1	37,3	8,6

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена *TMPRSS6* (матриптазы-2) в клетке, указанное двухцепочечное средство dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок,

где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-CUUCUUCUGGUUCAUUCUCCA-3' (SEQ ID NO: 223), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-UGGAGAAUGAACCAGAAGAAGCA-3' (SEQ ID NO: 292),

где каждая из указанной смысловой цепи и указанной антисмысловой цепи независимо составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов,

где практически все нуклеотиды смысловой цепи и практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и

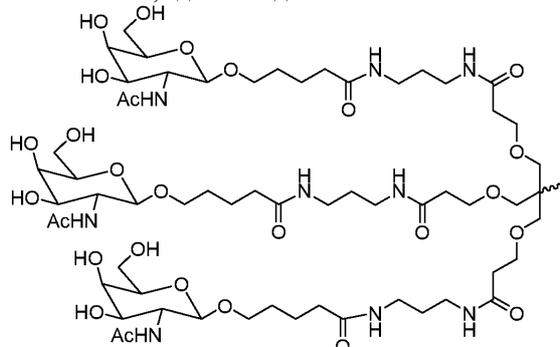
где указанная смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

2. Средство на основе dsRNA по п.1, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

3. Средство на основе dsRNA по п.1, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида или по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

4. Средство на основе dsRNA по п.1, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

5. Средство на основе dsRNA по п.1, где лигандом является



6. Средство на основе dsRNA по п.1, содержащее по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

7. Средство на основе dsRNA по п.6, которое содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

8. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена *TMPRSS6* (матриптазы-2) в клетке, средство dsRNA содержит смысловую и антисмысло-

вую цепь, образующие двухцепочечный участок,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-CUUCUUCUGGUUCAUUCUCCA-3' (SEQ ID NO: 223), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-UGGAGAAUGAACCAGAAGAAGCA-3' (SEQ ID NO: 292),

где каждая цепь независимо друг от друга составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов,

где практически все нуклеотиды смысловой цепи имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

где указанная смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

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

где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

9. Клетка, содержащая средство dsRNA по п.1.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая средство dsRNA по п.1.

11. Способ ингибирования экспрессии TMPRSS6 в клетке, при этом способ предусматривает

(а) приведение клетки в контакт со средством dsRNA по п.1 или фармацевтической композицией по п.15; и

(б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления mRNA-транскрипта гена TMPRSS6, с ингибированием тем самым экспрессии гена TMPRSS6 в клетке.

12. Способ лечения субъекта, имеющего наследственный гемохроматоз, β -талассемию или эритропоэтическую порфирию, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для dsRNA по п.1 или фармацевтической композиции по п.10.

13. Двухцепочечное средство dsRNA по п.1, где по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокси-тиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, запятого 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, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или имитатор 5'-фосфата, и концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты.

14. Двухцепочечное средство dsRNA по п.1, где двухцепочечный участок составляет в длину 17-25 пар нуклеотидов.

15. Двухцепочечное средство dsRNA по п.1, где смысловая цепь содержит

5'-CfsusUfcUfuCfuGfGfUfuCfaUfuCfuCfcA-3' (SEQ ID NO: 389) и антисмысловая цепь содержит 5'-usGfsgAfgAfaUfgAfaccAfgAfaGfaAfgscsa-3' (SEQ ID NO: 458), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-(2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор- A, G, C и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

16. Способ по п.12, где субъектом является человек.

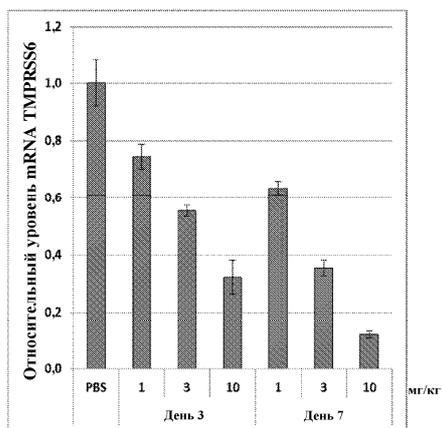
17. Способ по п.11, где указанная клетка является клеткой человека.

18. Способ по п.12, где субъектом является человек.

19. Способ по п.18, где у субъекта имеется наследственный гемохроматоз, β -талассемия или эритропоэтическая порфирия.

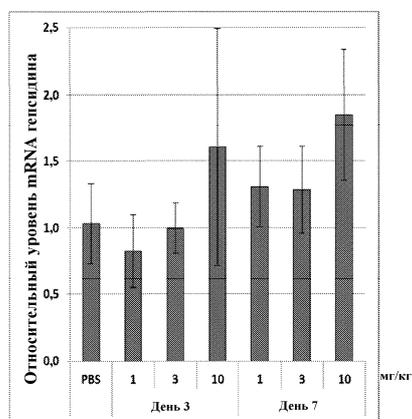
20. Способ по п.18, где у субъекта имеется расстройство, связанное с избытком железа, выбранное из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера или атаксии Фридрайха.

mRNA TMPRSS6

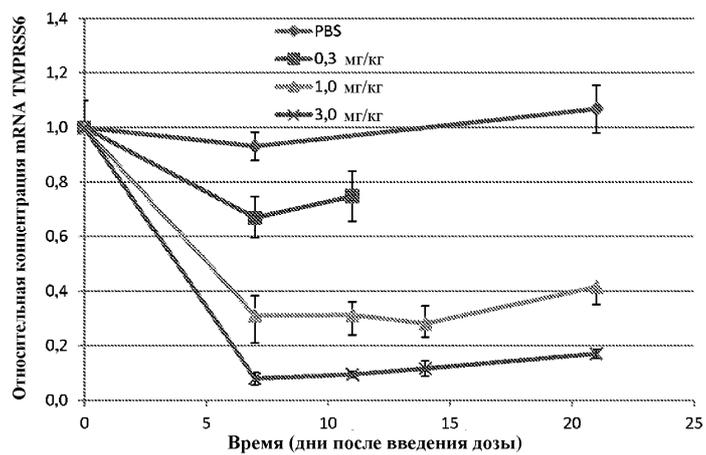


Фиг. 1

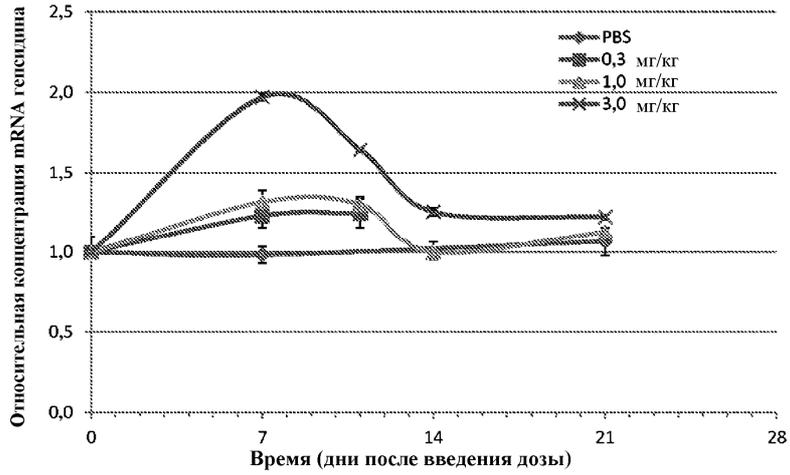
mRNA гепсидина



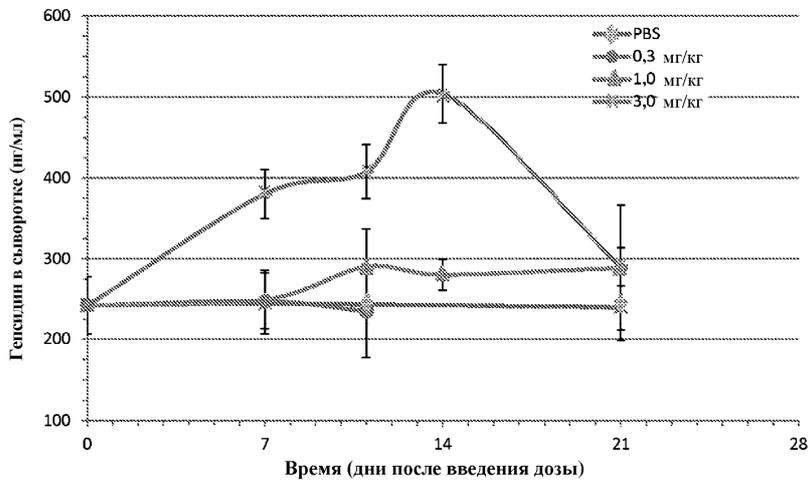
Фиг. 2



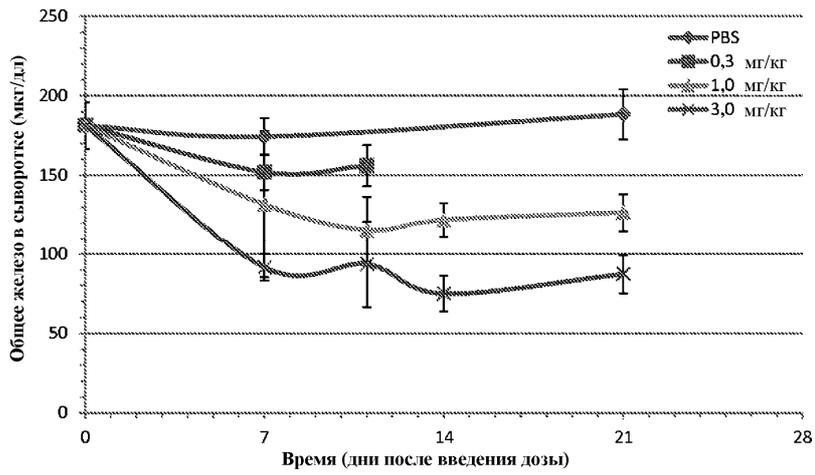
Фиг. 3А



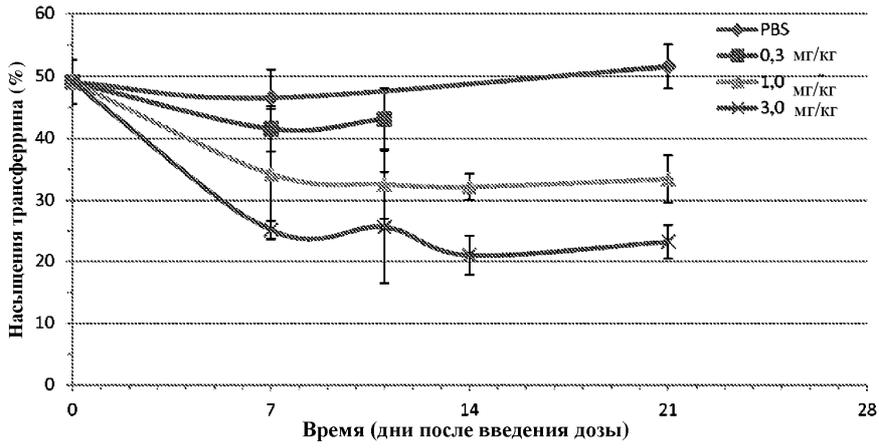
Фиг. 3В



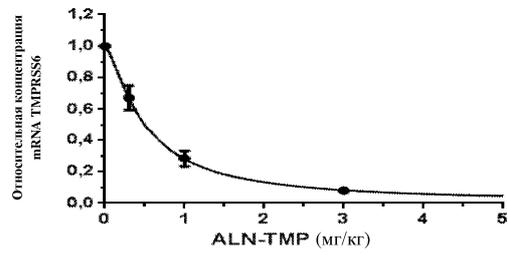
Фиг. 3С



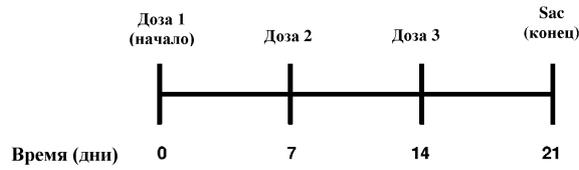
Фиг. 3D



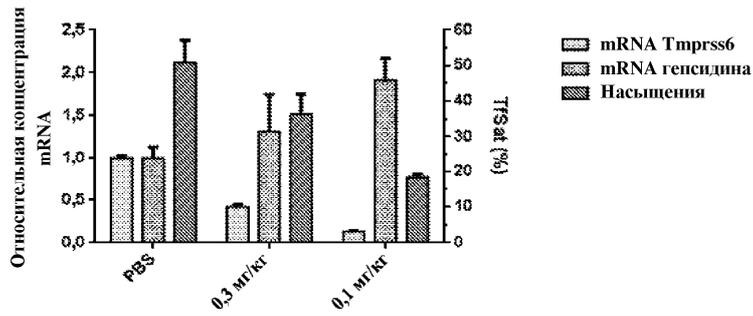
Фиг. 3Е



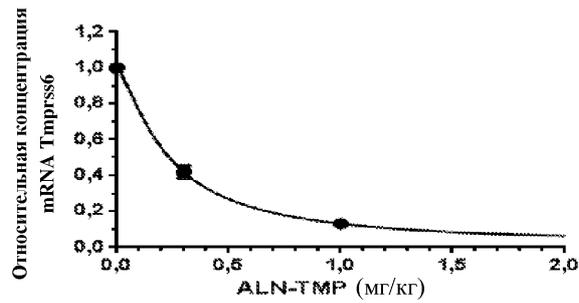
Фиг. 3F



Фиг. 4А

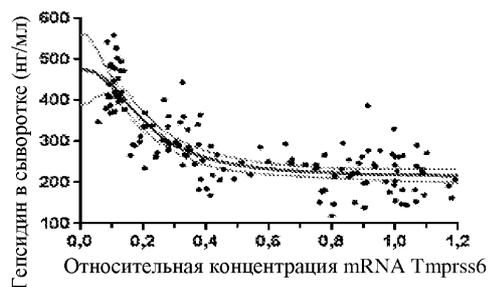


Фиг. 4В



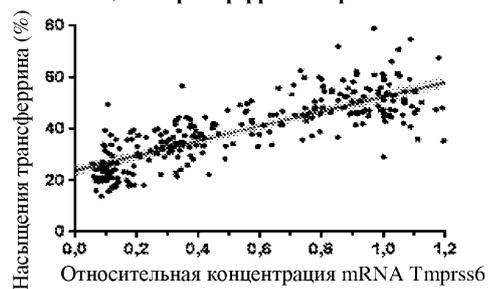
Фиг. 4С

Гепсидин в сыворотке в сравнении с mRNA Tmprss6



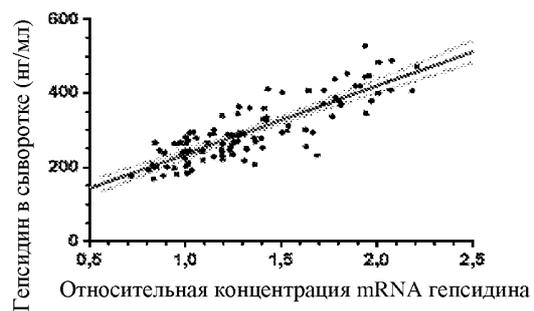
Фиг. 5А

Насыщение трансферрина в сравнении с mRNA Tmprss6



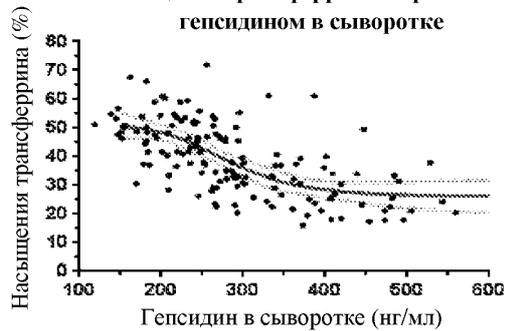
Фиг. 5В

Гепсидин в сыворотке в сравнении с mRNA гепсидина

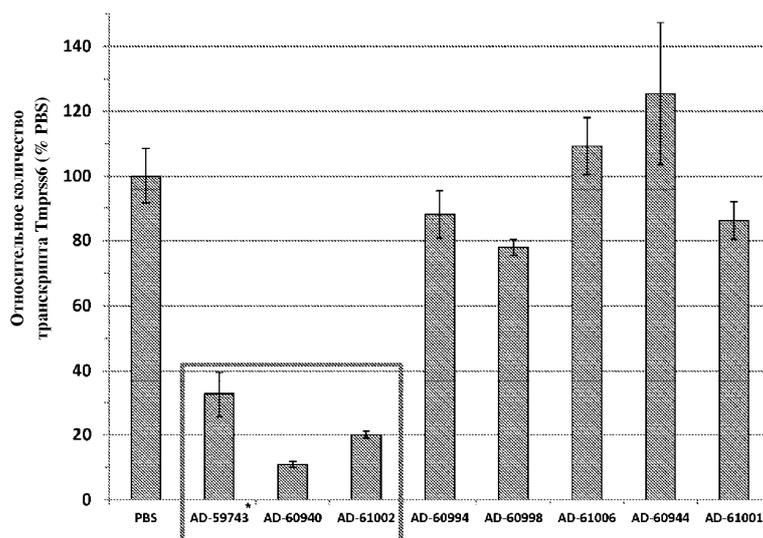


Фиг. 5С

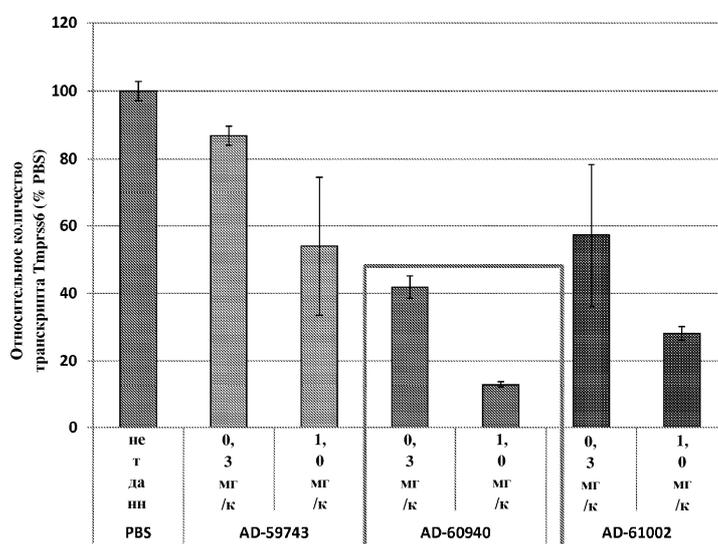
Насыщение трансферрина в сравнении с гепсидином в сыворотке



Фиг. 5D



Фиг. 6



Фиг. 7

SEQ ID NO:1

>gi56682967|reflNM_153609.2| трансмембранная протеаза, серин 6

Homo sapiens (TMPRSS6), mRNA

CTTGAGCCAGACCCAGTCCAGCTCTGGTGCCTGCCCTCTGGTGCAGAGCTGACCTGAGATGCACTTCCCTC
 CTCTGTGAGCTGTCTCGGCACCCACTTGCAGTCACTGCCGCTGATGTTGTTACTCTTCCACTCCAAAAG
 GATGCCCGTGGCCGAGGCCCCCAAGTGGCTGGCGGGCAGGGGACGGAGGTGATGGCGAGGAAGCGGAG
 CCGGAGGGGATGTTCAAGGCCTGTGAGGACTCCAAGAGAAAAGCCGGGGCTACCTCCGCTGGTGGCCC
 TGTTTGTGCTGCTGGCCCTGCTCGTGTGGCTTCGGCGGGGGTGTACTCTGGTATTTCTTAGGGTACAA
 GCGGAGGTGATGGTCAGCCAGGTGTAATCAGGCAGTCTGCGTGTACTCAATCGCCACTTCTCCCAGGAT
 CTTACCCGCGGGAAATCTAGTGCCTTCCGCAGTGAACCCGCCAAAGCCAGAAGATGCTCAAGGAGCTCA
 TCACCAGCACCCGCTGGGAACCTACTACAACCTCCAGTCCGCTCTATTCTTTGGGGAGGGACCCCTCAC
 CTGCTTCTTCTGGTTTCACTTCCAAAATCCCCGAGCACCCGCGCTGATGCTGAGCCCCGAGGTGGTGCAG
 GCACTGCTGGTGGAGGAGCTGCTGTCCACAGTCAACAGCTCGGCTGCCGTCCCCACAGGGCCGAGTACG
 AAGTGGACCCCGAGGGCCTAGTGATCTGGAAGCCAGTGTGAAAGACATAGCTGCATTGAATTCACGCT
 GGGTTGTTACCGCTACAGCTACGTGGGCCAGGGCCAGTCTCCGCTGAAGGGGCCGACACCTGGCC
 TCCAGCTGCCTGTGGCACCTGCAGGGCCCCAAGGACCTCATGCTCAAACCTCCGGCTGGAGTGGACGCTGG
 CAGAGTGGCGGGACCGACTGGCCATGTATGACGTGGCCGGGGCCCTGGAGAAGAGGCTCATCACCTCGGT
 GTACGGCTGCAGCCGCCAGGAGCCGCTGGTGGAGGTTCTGGCGTCCGGGGCCATCATGGCGGTCTGCTGG
 AAGAAGGGCTGCACAGCTACTACGACCCCTTCGTGCTCTCCGTGCAGCCGGTGGTCTTCCAGGCCTGTG
 AAGTGAACCTGACGCTGGACAACAGGCTCGACTCCCAGGGCGTCTCAGCACCCCGTACTTCCCAGCTA
 CTACTCGCCCCAAACCCACTGCTCCTGGCACCTCACGGTGCCTCTCTGGACTACGGCTTGGCCCTCTGG
 TTTGATGCCTATGCACTGAGGAGGCAGAAGTATGATTTGCCGTGCACCCAGGGCCAGTGGACGATCCAGA
 ACAGGAGGCTGTGTGGCTTGCGCATCTGCAGCCCTACGCCGAGAGGATCCCCGTGGTGGCCACGGCCGG
 GATCACCATCAACTTCACTCCAGATCTCCCTCACCGGGCCCGGTGTGCGGGTGCATATGGCTTGTAC
 AACCAGTCGGACCCCTGCCCTGGAGAGTTCTCTGTCTGTGAATGGACTCTGTGTCCCTGCTGTGATG
 GGGTCAAGGACTGCCCCAACGGCTGGATGAGAGAAACTGCGTTTGCAGAGCCACATCCAGTGCAAAGA
 GGACAGCACATGCATCTACTGCCCAAGGTCTGTGATGGGCAGCCTGATTTGTCTCAACGGCAGCGACGAA
 GAGCAGTGCCAGGAAGGGGTGCCATGTGGACATTCACCTTCCAGTGTGAGGACCGGAGCTGCGTGAAGA
 AGCCCAACCCGAGTGTGATGGGCGGCCGACTGCAGGGACGGCTCGGATGAGGAGCACTGTGACTGTGG
 CCTCCAGGGCCCTCCAGCCGATTTGTTGGTGGAGCTGTGTCTCCGAGGGTGTGATGGCCATGGCAGGCC
 AGCCTCCAGGTTCCGGGTCGACACATCTGTGGGGGGCCCTCATCGCTGACCGCTGGGTGATAACAGCTG
 CCCACTGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCTCCACGGTGTGTGGACCGTGTTCCTGGGCAAGGTGTGGCA
 GAACTCGCGCTGGCCTGGAGAGGTGCTTCAAGGTGAGCCGCTGCTCCTGCACCCGTACCACGAAGAG
 GACAGCCATGACTACGACGTGGCGCTGCTGCAGCTCGACCACCCGGTGGTGCCTCGGCCGCGCTGCGCC
 CCGTCTGCCTGCCCGCGCGCTCCCACTTCTTCGAGCCCGCTGCACTGCTGGATTACGGGCTGGGGCGC
 CTTGCGGAGGGCGGCCCATCAGCAACGCTCTGCAGAAAGTGGATGTGCAGTTGATCCACAGGACCTG
 TGCAGCGAGGTCTATCGCTACCAGGTGACGCCACGCATGTGTGTGCCGGCTACCGCAAGGGCAAGAAGG
 ATGCCGTGCAGGGTACTCAGGTGGTCCGCTGGTGTGCAAGGCACCTCAGTGGCCGCTGGTTCTCGCGGG
 GCTGGTCACTGGGGCCTGGGCTGTGGCCGGCCTAACTACTTCCGGCGTCTACACCCGCATCACAGGTGTG
 ATCAGCTGGATCCAGCAAGTGGTACCTGAGGAAGTCCCCCTGCAAAGCAGGGCCACCTCCTGGACT
 CAGAGAGCCAGGGCAACTGCCAAGCAGGGGGACAAGTATTCTGGCGGGGGTGGGGGAGAGAGCAGGCC
 CTGTGGTGGCAGGAGGTGGCATCTGTCTCGTCCCTGATGTCTGCTCCAGTGTGAGGAGGATGGAGA
 AGTGCCAGCAGCTGGGGGTCAAGACGTCCCTGAGGACCCAGGCCACACCCAGCCCTTCTGCCTCCCAA
 TTCTCTCTCTCCGTCCTTCTCCACTGCTGCCTAATGCAAGGCAGTGGCTCAGCAGCAAGAATGCTG
 GTTCTACATCCCGAGGAGTGTCTGAGGTGCGCCCCACTCTGTACAGAGGCTGTTTGGGCAGCCTTGCCTC
 CAGAGAGCAGATTCCAGCTTCGGAAGCCCTGGTCTAACTGGGATCTGGGAATGGAAGGTGCTCCCATC
 GGAGGGGACCTCAGAGCCCTGGAGACTGCCAGGTGGCCCTGCTGCCACTGTAAGCCAAAAGGTGGGGAA
 GTCTGACTCCAGGGTCTTGGCCCCCCTGCCTGCCACCTGGGCCCTCACAGCCAGACCTCACTGG
 GAGGTGAGCTCAGCTGCCCTTTGGAAATAAAGCTGCCTGATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Фиг. 8

SEQ ID NO: 2

>gi|125656151|ref|NM_027902.2| трансмембранная протеаза, серин 6

Mus musculus (TMPRSS6), mRNA

AGTTTCATTGTGCGCCCTGGACCTGACAGGAGAGGCCCATGGAACCTGGGGCCACAGGCCACAAGGGACAA
 GGGCCAGACACCCAGCCATGGCTCCAGGCCATTGATCCAACCTAAGCTGGCCAGTTGGGGGTGGAAAGA
 CCTTGGCCTGGATAAACAGAGGCCCTCCAGGCCTGTGTGCAGGCCCGGCACCTACSTTCCACTCTTGAAGA
 TGCCGAGATGTTTCCAGCTCCCTGTCTACCAGGATGCCACCACCGAGGTCCCCAAGCGGTGATGG
 TCAGGGCGATGCGGGTGATGGAGAGGAAGCTGCTGAGCCAGAGGGGAAGTTCAAGCCCCAAAAACACC
 AAGAGAAAAAACCGGACTACGTCCTGCTTACAGCCACTGTTGCTGGTCTTGGCTCGCTGGTCTCAGCAG
 GGGTCATGCTTTGGTATTTCCCTAGGGTACAAAGCGGAAGTGACCGTAAGCCAGGTGACTCTGGCAGCCT
 CCGGGTGCTCAACCGTCAATTTCTCCAGGACCTGGGCCGACGGGAGTCTATTGCTTTCCGCAGTGAATCT
 GCCAAAGCCCAGAAGATGCTCCAAGAAGTGGTTGCCAGCACCCGCTGGGTACTTACTACAACCTTAGTTC
 CTGTCTACTCCTTTGGGGAGGGACCCCTCACCTGCTTCTTCTGGTTTATCCTTGACATCCCTGAGTACCA
 GCGACTGACCCCTGAGCCCTGAAGTAGTGCAGGACTCCTGGTGGATGAGCTACTGTCCAACAGCTCAACC
 CTGGCTTCTATAAGACCGAATATGAGGTGGACCCGGAAGGCCTGGTGGATCCTGGAAGCCAGTGTGAACG
 ACATAGTCGTACTGAATTCACGCTGGGCTGTTATCGCTACAGCTATGTGAACCCAGGCCAGGTCTCTCC
 ATTGAAGGGGCTGACCAGCAGACCACAAGCTGCCTGTGGCATCTGCAAGGGCCGAAGACCTCATGATC
 AAAGTGCAGGCTGGAGTGGACCCGGGTGATTCAGAGACAGGGTGGCGATGTACGACGCAGCTGGGCCCC
 TGGAGAAGAGACTTATCACTCGGTCTATGGGTGCAGCCGCCAGGAACCTGTGATGGAGGTGCTGGCATC
 GGGCTCCGTGATGGCCGTGGTGTGGAAAAAGGGCATGCATAGCTACTATGACCCCTTCTCTGCTCTCAGTG
 AAGCTGTGGCCCTCCAGGACTGCCAGGTGAACCTGACACTGGAGGGCCGGCTGGACACACAGGGCTTCC
 TCCGTACACCCCTACTACCCAGTTACTCTCTCCAGTACCCACTGCTCCTGGCATCTCACGGTACCCCTC
 TCTGGACTACGGCTTGGCGCTCTGGTTCGATGCCTACGCCTGAGGAGGCAGAAGTACAACCGACTGTGT
 ACTCAGGGCCAGTGGATGATCCAGAACAGGAGGCTGTGTGGCTTCCGTACCCCTGCAGCCATATGCTGAGA
 GGATCCCCATGGTGGCCTCAGATGGTGTCAACATCAACTCACCTCCAGATCTCCCTCACAGGCCCGGG
 TGTGCAAGTGTACTACAGCTTGTACAACCAATCAGACCCCTGCCCTGGTGAGTTCCTCTGCTCTGTGAAT
 GGACTGTGTGCTCCCTGCGTGTGACGGGATCAAGGACTGCCCAATGGCCTGGATGAGAGAACTGTGTCT
 GCAGAGCCATGTTCCAGTGCCAAGAGGACAGCAGCTGCATTTCACTGCCTAGAGTCTGTGACCGGCAGCC
 CGACTGTCTCAATGGCAGTGACGAAGAACAGTGCCAAGAAGGAGTGCCCTGTGGGACATTTCACTTTCCAG
 TGTGAGGACCGGAGCTGTGTGAAGAAGCCCAACCCAGAGTGTGACCGCCAGTCAAGTTCAGAGACGGCT
 CAGATGAGCAACACTGTGACTGTGGCTCCAGGGCCTCTCCAGCCGATTTGTGGGCGGGACCGTGTCTC
 CGAGGGTGAGTGGCCATGGCAGGCCAGCCTCCAGATTCGGGGTGCACACATCTGTGGGGGGGCTCTCATC
 GCTGACCCGCTGGGTATAACGGCCGCCACTGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCCTCCCCGAAGCTGTGGA
 CCGTGTTCCTGGGAAAGATGCGGCAGAACTCGCGCTGGCCAGGCGAGGTGCTCTCAAGGTGAGCCGTC
 GTTCTGACCCGTACCACGAGGAGGACAGCCATGACTACGACGTGGCCCTGCTGCAGCTCGACCACCC
 GTGGTGTACTCGGCCACTGTGCGCCCCGTCTGCCTGCCTGCCGCTCCCACTTCTTTGAGCCAGGCCAGC
 ACTGCTGGATCACAGGCTGGGGAGCCAGCGAGAGGGTGGTCCGGTGAGCAACACCCCTGCAGAAGGTGGA
 CGTACAGCTGGTCCCTCAGGACCTCTGCAGTGAAGGCTACCGCTACCAGGTGTCCCCACGCATGCTCTGT
 GCTGGCTACCGCAAGGGCAAGAAAGATGCTTCCAGGGTACTCTGGAGGCCCACTGGTTTGCAGGGAGC
 CAGTGGCCGCTGGTTCCTGGCAGGGTGGTGTAGCTGGGGCTGGGCTGTGGCCGACCCAAATTTCTTTGG
 CGTCTACACCCGTGCACACGTGTGATCAACTGGATCCAGCAGGTGCTGACCTGAGGGCTGTTCTACAGA
 GCTGGACCTGCCTCCAGGCCAAGTTCAAGGTGTCCACCCAGCCAGGACACAAGTATTCTGGGGCAAGTGA
 CCCTGCTAAGGCCGTGTTTCCCTCAGGCCTACCCAGTGACAGTACAGAGAAGGATGTGAGCTGGTGGTTA
 GGATGCCTCCTGAGGTCCAGGGGCCAGCCTCGGCTAGGTTTCACTTCTAACCCTTTCTTATTCTAGTCTCT
 TTCCCTCCTGCTCTTACCCTGTTTTGGAGTGGGGTCTGGCGGCCATGACCTTGGCCTCCGGGTCTCT
 GTAGGAAAGAAAGAAATCCCTCCCTTGCAAAAGCCTCTTGGGGGAAGTGCACAGAGAAAGAAAGGTGCCCT
 TATCAAGGCTCTATCAGAGCCCTTGTGCTGCAAGTGGGCTGTAAGCTAAGCCAAATCACCGGGCAGCC
 TCAGCTGCAGATGCCTGTGAAGCTCTGCCTGTACAGGGGCCCTCCCTGCCATTTCACTGGAGGCCCACTG
 TCTGTTCTGGGAATAAAGCACTTGACCAAGCCCTGACACTGAAAAA

Фиг. 9

SEQ ID NO: 3

>gil194474097|reflNM_001130556.1| трансмембранная протеаза, серин 6
Rattus norvegicus (TMPRSS6), mRNA

ATTGTCCGTCCTGGACCTGACAGGAGGCCCATGGAACCTGGGGCCACAGGCCACGAGGGACAAGGGCCAG
ACACCCAGTCATGGTTCAGGCTATTGATCCAACSTAAGCTGGCCAGTTGTGGGTGGAGAGACCTTGGC
CTGGATAAACAGAGGCCCTCCAGGCCCTGTGTTCCAGGCCAGCACCTACCTTCCACTCTTGAAGATGCCAAG
ATGTTTCCAGCTCCCCTGTCTACCAGGATGCCCCACCGCTGAGGTTCCCAAGCAGCTGGTGGTCAGGGT
GATGGAGGTGATGGAGAGGAAGCTGCAGAGCCAGAGGGGGTGTCAAGGCCCCAGAAAACGCCAAGAGAA
AAGACAGGGACTACGTCCGCTTCACACCCTGTTGCTGGTCTTGGCTGCGTTGGCTTCGGCAGGAGTCAT
GCTCTGGTATTTCTAGGGTACAAGGCGGAAGTGACCATAAGCCAGGTGTACTCTGGCAGCCTCCGGGTG
CTCAACCGCCATTTTCACAGGACTTGGCCCAGCGGGAGTCTATTGCTTCCGCACTGAAACTGCCAAAG
CCCAGAAGATGTTCCAAGAGCTGGTTGCCAGCACCCGCTTGGGTACTTACTACAACCTCCAGTTCATCTA
CGCCTTTGGGGAGGGACCCCTTATCTGCTTCTTCTGGTTCATCCTTGACATCCCCGAGTACCAGCGACTG
ACCCTGAGCCCTGAGGTGGTGCAGGAGCTCCTGGTGGGTGAGCTACTGTCCAACAGCTCAGCCTTGGCTT
CCTATAGGACCGAATATGAGGTGGACCCGGAAGGCCCTGGTGATACTAGAAGCCAGCGTGAACGACATAGT
CGTACTGAATTCACGCTGGGCTGTTACCGCTACAGCTACGTGAACCCGGGCCAGGTCTCCGGTTGAGG
GGGCCGACACAGCAGACCACTAGCTGCCTGTGGCACCTGCAGGGGCCGAGGACCTCATGCTCAAAGTGC
AGCTAGAGTGGACTCGGGTTGATTGCAGAGACAGGGTGGCGATGTACGACGCAGCTGGGCCCTGGAGAA
GAGACTTATCACCTCGGTCTATGGGTGCAGCCGCCAGGAACCCGTGATGGAGGTGCTGGCGTCGGGCTCT
GTCATGGCCGTGGTGTGGAAGAAGGGCTTGCATAGCTTCTATGACCCTTTCTGCTCTCAGTGAAGTCTG
TGGCCTTCCAGGACTGCCAGGTGAACCTGACCCTGGAAGGCCGGCTGGATCCACAGGGCTTCCCTCCGTAC
ACCCTACTACCCGTTACTACTCGCCAGTACCCTGACTGCTCCTGGCATCTCACGGTTCCTCTCTGGAC
TATGGCTTGGCACTCTGGTTTGACGCCTATGCATGAGGAGGCAGAAAGTACAACCTACTATGTACTCAGG
GCCAGTGGATGATCCAGAACAGGAGGCTATGTGGCTTCCGTACCTGCAGCCATATGCTGAGAGGATCCC
CGTGGTGGCCTCGGATGGTATCACCATCAACTTCACCTCCCAGATCTCCCTCACAGGCCCGGGTGTGCAA
GTGTACTACAGCTTGTACAACCAATCAGACCCCTGCCCTGGAGAGTTCCCTCTGCTCTGTGAATGGATTGT
GTGTCCCTGCTTGTGACGGAATCAAGGACTGCCCAACGGCCTGGATGAGAGGAACTGTGTCTGCAGAGC
CATGTTCCAGTGCCAAGAGGACAGCACGTGCATCTCACTGCCGAGAGTCTGTGACCCGGCAGCCCGACTGT
CTCAATGGTAGCGACGAAGAGCAGTGCCAAGAAGGAGTGCCCTGTGGGACATCACTTTCCAGTGTGAGG
ACCGGAGCTGTGTGAAGAAGCCCAACCCCGAGTGTGACGGGCAGGCAGACTGCAGGGATGGCTCGGATGA
GGAGCACTGTGACTGTGGCCTCCAGGGCCCTCCAGCCGCAATTGTGGGCGGGGCATGTCTCGGAGGGT
GAGTGGCCCTGGCAGGCCAGTCTCCAGATTCGGGGTGCACACATCTGTGGGGGGCTCTCATCGCTGACC
GCTGGGTACATAACAGCCGCTCACTGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCTCCCCGAGGCTGTGGACCGTGT
TCTGGGAAAGATGCGGCAGAATTCACGCTGGCCGGGCGAGGTGTCTTCAAGGTGAGCCGCTGTTCCTG
CACCCGTATCATGAGGAGGACAGCCATGACTACGACGTGGCCCTGCTGCAGCTGGACCACCTGTGGTGT
ACTCGGCCACCGTGCGCCCCGCTGCTGCCCGCACGCTCTCACTTCTTTGAGCCAGGCCAGCACTGCTG
GATCACAGGCTGGGGAGCCCAGCGAGAGGGTGGTCTGGTAGCAGCACCTTCAGAAGGTGGATGTGCAA
CTGATCCCTCAGGACCTGTGCAATGAGGCCTACCGTTACCAGGTGACCCACGCATGCTCTGTGCTGGTT
ATCGCAAGGGCAAGAAAGATGCCTGCCAGGGCGACTCTGGAGGCCCACTGGTTTGAAGGAGCCAGGTG
ACCACCCAGCCAGGGCACAAGTATTCGGGGCGAGCGACCTGCTAAGGCCTGTCCCTCATGCCTACCC
CAGGGACAGTACAGAGAAGGATGTGAGCTGGTGGTTAGGATGCCTCCAGGGGCTAGCCTCAGCTCGGCTT
CACTTCCAACCTTTCTTATTCTAGTCTTTCCCTCTCCCTCCTACTGCTGTTTTGGGGTGGGGTCTG
GTGGCAATGATGCTGGTTCCAAGGTCTGTGGGAAAGTAAAGATTCCTTCCCCTTGCAAAAGCCTCTAGGGG
GAACTGGATCCGAGAAAAGAGGTGCCTCTATCAAGGCTCTGTGAGGCCCTTGAGACTGCCAAGTAGGGC
CATACCGTAAGCCAAATCATGGGGCAGCCTCAGCTGCGGGTGCCTGCTGTGCTCTGCCTGCTACAGGGCC
CTCCCTGCCATCACTGGAGGCCCACTGTCTGTTCCGAAATAAAGCAGTTGGCCAAGC

Фиг. 10

SEQ ID NO: 4

>gi|297260989|reflXM_001085203.2|ПРОГНОЗИРОВАННАЯ: *Masaca mulatta*, трансмембранная протеаза, серин 6, вариант 3 транскрипта (TMPRSS6), mRNA
CAGGATGCCTGTGGCCAAGGCCCCAGGTGGCTGGTGGGCAGGGGACGGAGGTGATGGCGAGGAAGCG
GAGCCAGAGGGGATGTTTCGAGGCCCGTGAGGACTCCAAGAGAAAAGCCCGGGGTACCTCCGCCTGGCGC
CCCTGTGGCTGACCSTGGTTGTGCTGACTTCAGTGGGGGTGCTACTCTGGTATTTCCTAGGGTACAAGGC
GGAGGTGACGGTCAGCCAGGTGTACTCAGGCAGCCTGCGCGTCTCAATCGCCACTTCTCCAGGATCTT
ACCCGCCGGGAATCCAGTGCCTTCCGCAGTGA AACCGCCAAAGCCAGAAAGATGCTCAAGGAGCTCATCG
CCAGCACCCGCCSTGGGAACCTTATTACAACCTCCAGCTCCGTCTATTCCSTTTGGGGAGGGACCCGCTCACCTG
CTTCTTCTGGTTCAATCTCCAAATCCCCGAGCACCGCCGGCTGATGCTGAGCCCCGAGGTGGTGCAGGCA
CTGCTGGTGGAGGAGCTGCTGTCCACAGTCAACAGCTCGGCGGCTGTCCCCTACAGGGCCGAGTACGAAG
TGGACCCCGAGGGCCTAGTGTATCCTAGAAGCCAGTGTGAAAGACATAGCTGCACTGAATCCACGCTGGG
TTGTTACCCTACAGCTACGTGGGCCAGGGTCAGTCTCCGGCTGAAGGGACCCGACCACCTGGCCCTCC
AGTGCCTGTGGCCACTGCAGGGCCCCGAAGACCTATGCTGAAACTCCGGCTGGAGTGGACGCTGGCCG
AGTGCCGGGACCGACTGGCCATGTATGACGTGGCTGGGCCCTGGAGAAGAGGCTCATCACCTCGGTGTA
TGGCTGCAGCCGCCAGGAGCCTGTGGTGGAAATCCTGGCATCGGGGGCCATCATGGCGGTGGTCTGGAAG
AAGGGCCTGCACAGCTACTACGACCCCTTTATGCTCTCCGTGCAGTCCGGTGGTCTTCCAGGCCTGCGAGG
TAAACCTGACGCTGGATGACAGGCTGGACTCCCAGGGCGTCTCAGCACCCCGTACTTCCCCAGCTACTA
CTCGCCCCGAACCCACTGCTCCTGGCACCTCACGGTGCCCTCTCTGGACTACGGCTTGGCCCTCTGGTTT
GACGCTACGCACTGCGGAGGCAGAAGTATGATTTGCCGTGCACCCAGGGCCAGTGGACGATCCAGAACA
GGAGGCTGTGTGGCCTGCGCATCTGCAGCCTTACGCCGAGAGGATCCCCGTGGTGGCCACGGCCGGCAT
CACCATCAATTTCACTCCAGATCTCCCTCACAGGGCCTGGTGTGCGGGTGCACATATGGCTTGTACAAC
CAGTCCGACCCCTGCCCTGGAGAGTTCCTCTGCTCTGTGAACGGACTCTGCGTCCCTGCCTGTGATGGGG
TCAAGGACTGCCCAACCGCCTGGATGAGAGAAACTGCGTTTGCAGAGCCACATTCAGTGCCAAGAGGA
CAGCACGTGCATCTCACTGCTTAAGGTCTGTGACGGGCAGCCTGACTGTCTCAACGGCAGCGATGAAGAG
CGGTGCCAGGAAGGGGTGCCCTGCGGGACATTCACCTTCCAGTGTGAGGACCAGAGCTGCGTGAAGAAGC
CCAACCCACAGTGTGATGGGCGGCCGACTGCAGGGACGGCTCAGACGAGCAGCACTGTGACTGTGGCCT
CCAGGGCCCTCCAGTGCATTTGTGGTGGGGCCGTGCTCCTCCGAGGGTGAAGTGGCCATGGCAGGCCAGC
CTCCAGGTTCCGGGGTGCACACATCTGTGGGGGCGCCCTCATCGCTGACCGCTGGGTGATAACAGCTGCC
ATTGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCC TCCCCGCGCTGTGGACGGTGTTCCTGGGCAAGGTGTGGCAGAA
CTCGCGCTGGCCTGGAGAGGTGTCTTCAAGGTGAGCCGCC TACTCCTGCATCCGTATCACGAAGAGGAC
AGCCACGACTACGACGTGGCGCTGTTGCAGTTCGACCACCCGGTGGTGCCTCGGCCGCCGTGCGTCCAG
TCTGCCTGCCCGCGCTCCCACTTCTTGAACCCGGCTGCACTGCTGGATCACTGGCTGGGGCGCCCT
GCGCGAAGGCGGCCCCACCAGCAATGCTCTGCAGAAAGTGGACGTGCAGTTGATCCACAGGACCTGTGC
AGCGAGGCCTATCGCTACCAGGTGACGCCACGCATGCTGTGTGCCGGCTACCGCAAGGGCAAGAAGGATG
CCTGCCAGGGTGA CTGGGTGGTCCGCTGGTATGCAAGGCACTCAGTGGCCGCTGGTTCCTGGCAGGGCT
GGTCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGCCGGCCTAACTACTTCGGCGTCTACACCCGCATCACAGGTGTGATC
GGCTGGATCCAGCAAGTGGTACCTGAGGAACTGCCCCCTGCAGAGCAGGTCCACCTC

Фиг. 11

SEQ ID NO:5

>gil109094061|reflXM_001085319.1|ПРОГНОЗИРОВАННАЯ: Масаса mulatta подобная mRNA трансмембранная протеаза, серин 6, вариант 4 транскрипта (LOC696094)

СТТGAGCCACACCCAGTCCAGCTCTGGTGCCTGCCCTCTGGGGTGAGCTGCCTTGAGATGCACTTCGCTC
 CTCTGTGAACGTCTCGGCACCCACTTCCGGTCACTGCCGCCTGATGTTGTTACTCTTCCACTCTGAAAG
 GATGCCTGTGGCCAAGGCCCCCGAGGTGGCTGGTGGGCAGGGGGACGGAGGTGATGGCGAGGAAGCGGAG
 CCAGAGGGGATGTTTCGAGGCCCGTGAGGACTCCAAGAGAAAAGCCCGGGGCTACCTCCGCCTGGCGCCCC
 TGTGGCTGACCCCTGGTTGTGCTGACTTCAGTGGGGGTGCTACTCTGGTATTTCTAGGGTACAAGCGGGA
 GGTGACGGTCAGCCAGGTGTACTCAGGCAGCTGCGCGTGC TCAATCGCCACTTCTCCCAGGATCTTACC
 CGCCGGGAATCCAGTGCCTTCCGCAGTGAACCCGCCAAAGCCAGAAGATGCTCAAGGAGCTCATCGCCA
 GCACCCGCCTGGGAACCTTATTACAACCTCCAGCTCCGTCTATTCCCTTTGGGGAGGGACCGCTCACCTGCTT
 CTTCTGGTTCAATTCTCCAAAATCCCCGAGCACCGCCGGCTGATGCTGAGCCCCGAGGTGGTGCAGGCACTG
 CTGGTGGAGGAGCTGCTGTCCACAGTCAACAGCTCGGCGGCTGTCCCCTACAGGGCCGAGTACGAAGTGG
 ACCCCGAGGGCCTAGTGATCCTAGAAGCCAGTGTGAAAGACATAGCTGCACTGAATTCACGCTGGGTG
 TTACCGCTACAGCTACGTGGGCCAGGGTCAGGTCTCCGGCTGAAGGGACCCGACCACCTGGCTCCAGC
 TGCCTGTGGCACCCTGCAGGGCCCCGAAGACCTCATGCTGAAACTCCGGCTGGAGTGGACGCTGGCCGAGT
 GCGGGGACCAGCTGGCCATGTATGACGTGGCTGGGCCCTGGAGAAGAGGCTCATCACCTCGGTGTATGG
 CTGCAGCCGCCAGGAGCCTGTGGTGGAAAGTCTGGCATCGGGGCCATCATGGCGGTGGTCTGGAAGAAG
 GGCTGCACAGCTACTACGACCCCTTTATGCTCTCCGTGCAGTCGGTGGTCTTCCAGGCCTGCGAGGTAA
 ACCTGACGCTGGATGACAGGCTGGACTCCCAGGGCGTCTCAGCACCCCGTACTTCCCAGCTACTACTC
 GCCCCGAACCCACTGCTCCTGGCACCTCACGGTGCCTCTCTGGACTACGGCTTGGCCCTCTGGTTTAC
 GCCTACGCACTGCGGAGGCGAGAAGTATGATTTGCCGTGCACCCAGGGCCAGTGGACGATCCAGAACAGGA
 GGCTGTGTGGCCTGCGCATCCTGCAGCCTTACGCCGAGAGGATCCCCTGGTGGCCACGGCCGGCATCAC
 CATCAATTTCACTCCCAGATCTCCCTCACAGGGCCTGGTGTGCGGGTGCACATATGGCTGTACAACCAG
 TCGGACCCCTGCCCTGGAGAGTTCCTCTGCTCTGTGAACGGACTCTGCGTCCCTGCCCTGTGATGGGGTCA
 AGGACTGCCCAACGGCCTGGATGAGAGAAACTGCGTTTGCAGAGCCACATTCAGTGCCAAGAGGACAG
 CACGTGCATCTCACTGCTTAAGGTCTGTGACGGGCAGCCTGACTGTCTCAACGGCAGCGATGAAGAGCGG
 TGCCAGGAAGGGGTGCCCTGCGGGACATTCACCTTCCAGTGTGAGGACCAGAGCTGCGTGAAGAAGCCCA
 ACCACAGTGTGATGGGGCGCCGACTGCAGGGACGGCTCAGACGAGCAGCACTGTGACTGTGGCCTCCA
 GGGCCCTCCAGTGCATTTGTTGGTGGGGCCGTGTCTCCTCCGAGGGTGAGTGGCCATGGCAGGCCAGCCTC
 CAGGTTCCGGGTGCGACACATCTGTGGGGGCGCCCTCATCGTGACCGCTGGGTGATAACAGCTGCCCAT
 GCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCTCCCAGGCGCTGTGGACGGTGTTCCTGGGCAAGGTGTGGCAGAATC
 GCGCTGGCCTGGAGAGGTGTCTTCAAGGTGAGCCGCCTACTCCTGCATCCGTATCACGAAGAGGACAGC
 CACGACTACGACGTGGCGCTGTGTGAGCTCGACCACCCGGTGGTGGCTCGGCTCGGCCCGCTGCGTCCAGTCT
 GCCTGCCCCGCGCTCCCACTTCTTGAACCCGGCTGCACCTGCTGGATCACTGGCTGGGGCGCCCTGCG
 CGAAGGCGGCCCCACAGCAATGCTCTGCAGAAAAGTGGACGTGCAGTTGATCCACAGGACCTGTGCAGC
 GAGGCCTATCGCTACCAGGTGACGCCACGCATGCTGTGTGCGGCTACCGCAAGGGCAAGAAGGATGCCT
 GCCAGGGTGA CTGGGTGGTCCGCTGGTATGCAAGGCACCTCAGTGGCCGCTGGTTCCTGGCAGGCTGGT
 CAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGCCGGCCTAACTACTTCGGCGTCTACACCCGCATCACAGGTGTGATCGGC
 TGGATCCAGCAAGTGGTACCTGAGGAACTGCCCCCTGCAGAGCAGGTCCACCTCTTGGACTCAGAGA
 GCCAGGGCAATTGCCAAGCAGGGGACAAGTATTCTGGGGGAGGGGGCGCGAGCAGGCCCTGTGGTG
 GCAGGAGGTGGCATCTTGTCTTGTCCCTGATGTCTGCTCCAGTGA TGGCAGGAGGATGGAGGAGTGCCAG
 CAGCTGGGGGTCAAGACGTCCCCTAGGGACCCAGGCCACACCCAGCCCTTCTGCCTCCCGATTCTCTCT
 CCTCTGTCCCCTTCTCCACTGCTGCCTATTGCAAGGAAGTGGCTCAGCAGCAAGAATGCTGGCTCTACG
 TCCCCAGGAGTGTCTGAGCTGTGCCCCACTCTGTACAGAGGCTGCTTGGGCAGCCTTGCCTCTAGAGAGC
 AGATGCCAGCTTCGGAAGCCCTGGTCTAACTTGGGATCTGGGAATGGAAGGTGCCCCCATAGGAGGGGA
 CCTCACAGCCCCGGGACTGCCAGGTGGGCGGGTGCACCGTAAGCCAAAAAAGGTGGGGAGCCCTG
 ACTCCAAGGTCTTGGCCACCCCTGCCTGCCACCTGGCCCTCACAGCCCAGACCTCACCGGCAGGTG
 AGCTCAGCTGCCCTTTGGAATAAAGTGCCTGATCCTAA

Фиг. 12

SEQ ID NO:6

Обратная комплементарная последовательность >gi56682967|reflNM_153609.2|
 трансмембранная протеаза, серин 6 (TMPRSS6), mRNA

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTCAGGCAGCTTTATTCCAAAGGGCAGCTGAGCTCACCTCCCAGTGAGGG
 TCTGGGCTGTGAGGGCCAGGTGGCAGGCAGGGGTGGGGCAAGGACCCTGGAGTCAGGACTTCCCCACSTTT
 TGGCTTACAGTGGCAGCAGGCCACSTGGCAGTCTCCAGGGCTCTGAGGGTCCCCTCCGATGGGAGCACSTT
 CCATTCAGATCCCAGTTAGACCAGGGGCTTCCGAAGCTGGAATCTGCTCTCTGGAGGCAAGGCTGCCCA
 AACAGCCTCTGTACAGAGTGGGGCGCACCTCAGACACTCCTCGGGATGTAGAACCAGCATCTTGTCTGTA
 GCCACTGCCTTGCATTAGGCAGCAGTGGAGGAAGGGGACGGAGGAGAGAGAATTGGGAGGCAGAAGGGCTGG
 GTGTGGGCTGGGTCTCAGGGGACGTCTTGACCCCCAGCTGCTGGCACTTCTCCATCCTCTGCCATCACT
 GGAGCAGACATCAGGGACGAGACAAGATGCCACCTCCTGCCACCACAGGGCCTGCTCTCTCCCCACCCCC
 GCCAGAATACTTGTCCCCCTGCTTGGCAGTTGCCCTGGGCTCTCTGAGTCCAGGAGGTGGGCCCTGCTTTGC
 AGGGGGCAGTTCCCTCAGGTCACTTGTCTGGATCCAGCTGATCACACCTGTGATGCGGGTGTAGACGCCG
 AAGTAGTTAGGCCGGCCACAGCCCAGGCCCCAGCTGACCAGCCCCGCCAGGAACCAGCGGCCACTGAGTGCC
 TTGCACACCAGCGGACCACCTGAGTCACCTGACAGGCATCCTTCTTGCCCTTGCGGTAGCCGGCAGCAGC
 ATGCGTGGCGTCACTGGTAGCGATAGACCTCGCTGCACAGGTCCTGTGGGATCAACTGCACATCCACTTTC
 TGCAGAGCGTTGCTGATGGGGCCGCCCTCGCGCAAGGCGCCCCAGCCCGTAATCCAGCAGTGCAGGCCGGGC
 TCGAAGAAGTGGGAGCGCGCGGGCAGGCAGACGGGGCGCACGGCGGCCGAGCGCACACCAGGGTGGTCGAGC
 TGCAGCAGCGCCACGTCGTAGTCATGGCTGTCTCTCTCGTGGTACGGGTGCAGGAGCAGGCGGCTCACCTTG
 AAGGACACCTCTCCAGGCCAGCGGAGTTCTGCCACACCTTGCCAGGAACACGGTCCACAGCACCGTGGAG
 GCCATGCTGTCTCTCGAAGCAGTGGGCAGCTGTTATCACCCAGCGGTGAGCGATGAGGGCCCCCCCCACAG
 ATGTGTGACCCCCGAACCTGGAGGCTGGCCTGCCATGGCCACTCACCTCGGAGGACACAGCTCCACCAACA
 ATGCGGCTGGAGGGGCCCTGGAGGCCACAGTCACAGTGTCTCTCATCCGAGCCGTCCCTGCAGTCGGGCCGC
 CCATCACACTGCGGGTGGGCTTCTTTCACGCAGCTCCGGTCTCACACTGGAAGGTGAATGTCCACATGGC
 ACCCTTCTGTCAGTGTCTTTCGTCGCTGCCGTGAGACAATCAGGCTGCCATCACAGACCTTGGGCAGT
 GAGATGCATGTGCTGTCTCTTTCGACTGGAATGTGGCTCTGCAAACGCAGTTTCTCTCATCCAGGCCGTTG
 GGGCAGTCTTGACCCCATCACAGGCAGGGACACAGAGTCCATTACAGAACAGAGGAACCTCCAGGGCAG
 GGGTCCGACTGGTGTACAAGCCATAGTGCACCCGCACACCGGGCCCGGTGAGGGAGATCTGGGAGGTGAAG
 TTGATGGTGTATCCCGCCGTGGCCACCACGGGGATCTCTCGGGCTAGGGCTGCAGGATGCGCAAGCCACAC
 AGCCTCCTGTCTGGATCGTCCACTGGCCCTGGGTGCACGGCAATCATACTTCTGCCCTCCTCAGTGCATAG
 GCATCAAACCAGAGGGCCAGCCGTAGTCCAGAGAGGGCACCGTGAGGTGCCAGGAGCAGTGGGTTTGGGGC
 GAGTAGTAGCTGGGGAAGTACGGGGTGTGAGGACGCCCTGGGAGTGCAGCCGTTGTGTCAGCGTCAAGTTT
 ACTTTCACAGGCTGGAAGACCACCGGCTGCACGGAGAGCACGAAGGGGTGCTAGTAGCTGTGCAGGCCCTT
 TTCCAGACGACCCGCTATGATGGCCCCGACGCCAGAACCTCCACCACGGGCTCCTGGCGGCTGCAGCTTAC
 ACCGAGGTGATGAGCCTTCTCCAGGGGCCCGGCCACGTCATACATGGCCAGTCGGTCCCGGCACTCTGCC
 AGCGTCCACTCCAGCCGAGTGTGAGCATGAGGTCTTGGGGCCCTGCAGGTGCCACAGGCAGCTGGAGGCC
 AGGTGGTCAGGCCCTTCCAGCCGAGGACCTGGCCCTGGCCACGTCAGTGTAGCGGTAACAACCCAGCGTG
 GAATTCATGACAGCTATGCTTTTTCACACTGGCTTCCAGGATCACTAGGCCCTCGGGGTCCACTTCGTA
 GCTGCTAGGGGACGGCAGCCGAGCTGTTGACTGTGGACAGCAGCTCCTCCACCAGCAGTGCCTGCACCACC
 TCGGGGCTCAGCATCAGCCGGCGGTGCTCGGGGATTTGGAGAATGAACCAGAAGAAGCAGGTGAGGGGTCCC
 TCCCCAAAGGAATAGACGGAGCTGGAGTTGTAGTAAGTTCCAGGCGGGTGTGGTGTAGGCTCCTTGGAGC
 ATCTTCTGGGCTTTGGCGGTTTCACTGCGGAAGGCACTAGATTCAGGCGGGTAAGATCCTGGGAGAAGTGG
 CGATTGAGTACACGCAGACTGCCTGAGTACACCTGGCTGACCATCACCTCCGCCTTGTACCCCTAGGAAATAC
 CAGAGTAGCACCCCGCCGAAGCCAGCACGAGCAGGGCCAGCAGCACAAACAGGGGCACCAGGCGGAGGTAG
 CCCCAGGGCTTTTCTCTTGGAGTCTCACAGGCCTTGAACATCCCCCTCCGGCTCCGCTTCTCGCCATCACCT
 CCGTCCCCCTGCCCGCCAGCCACCTGGGGGGCCTCGGCCACGGGCATCCTTTTGGAGTGGAAAGATCAAC
 ATCAGGCGGCAGTGAAGTGGGTGCCGAGACAGCTCACAGAGGAGGGAAGTGCATCTCAGGTCAGCTC
 GCACCAGAGGGCAGGCACCAGAGCTGGACTGGGTCTGGCTCAAG

Фиг. 13

SEQ ID NO: 7

Обратная комплементарная последовательность >gil125656151|reflNM_027902.2|

трансмембранная протеаза Homo sapiens, серин 6 (TMPRSS6), mRNA

TTTTTTTTTTTTTTTCAGTGTCAAGGGCTTGGTCAAGTGCTTTATTCCAGAACAGACAGTGGGCCCTCCAGTG
 AATGGCAGGGAGGCCCTGTAGCAGGCAGAGCTTCAGCAGGCATCTGCAGCTGAGGCTGCCCGGTGATTTGG
 CTTAGAGTACAGCCCACTTGGCAGACTCAAGGGCTCTGATAGAGCCTTGATAGAGGCACCTTCTTTCTCTGT
 GCAGTTCCCCAAGAGGCTTTTGAAGGGGAAGGATTCTTTCTTTCTTACAGAGACCCGGAGGCCAAGGTCA
 TGGCCGCCAGACCCCACTCCAAAACAGTGGTAGGAGCAGGGAGGGGAAAGGACTAGAATAAGAAAGGGTTAG
 AAGTGAACCTTAGCCGAGGCTGGCCCTGGACCTCAGGAGGCATCCTAACACCAGCTGACATCCTTCTCTG
 TACTGTCACTGGGGTAGGCCTGAGGGAAACAGGCCTTAGCAGGGTCACCTGCCCCAGAATACTTGTGTCTG
 GCTGGGTGGACACCCTGAACTTGGCCTGGAGGCAGGTCCAGCTCTGTAGAACAGCCCTCAGGTCAGCACCTG
 CTGGATCCAGTTGATCACACGTGTGACACGGGTGTAGACGCCAAAGAAATTGGGTCCGGCCACAGCCAGGCC
 CCAGCTAACCAACCCTGCCAGGAACCAGCGGCCACTGGGCTCCCTGCAAACAGTGGGCCTCCAGAGTCACC
 CTGGCAGGCATCTTTCTTGGCCCTTGGCGTAGCCAGCACAGAGCATGCGTGGGGACACCTGGTAGCGGTAGGC
 CTCACTGCAGAGGTCCTGAGGGACCACTGTACGTCCACCTTCTGCAGGGTGTGCTCACCGGACCACCCCTC
 TCGCTGGGCTCCCCAGCCTGTGATCCAGCAGTGTGGCCTGGCTCAAAGAAGTGGGAGCGGGCAGGCAGGCA
 GACGGGGCGCACAGTGGCCGAGTACACCACGGGTGGTGCAGCTGCAGCAGGGCCACGTCGTAGTCATGGCT
 GTCCTCCTCGTGGTACGGGTGCAGGAACAGACGGCTCACCTTGAAGGACACCTCGCCTGGCCAGCGCAGT
 CTGCCGCATCTTTCCAGGAACACGGTCCACAGCTTCGGGGAGGCCATGCTGTCTCTCTGGAAGCAGTGGGC
 GGCCGTTATGACCAGCGGTGAGCGATGAGAGCCCCCACAGATGTGTGACCCCCGAATCTGGAGGCTGGC
 CTGGCCATGGCCACTACCTTCGGAGGACACGGTCCCGCCACAATACGGCTGGAGAGGCCCTGGAGGCCACA
 GTCCACAGTTGTGCTCATCTGAGCCGTCTCTGCAATCTGACTGGCCGTCACTCTGGGTGGGCTTCTTAC
 ACAGCTCCGGTCCACACTGGAAAGTGAATGTCCACAGGGCACCTCCTTCTGGCACGTGTTCTTCGTCCT
 GCCATTGAGACAGTCCGGCTGCCGGTCCAGACTCTAGGCAGTGAAATGCACGTGCTGTCTCTTGGCACTG
 GAACATGGCTCTGCAGACACAGTCTTCTCTCATCCAGGCCATTGGGGCAGTCCTTGATCCCGTCCACAGCAGG
 GACACACAGTCCATTACAGAGCAGAGGAACCTCACAGGGCAGGGGTCTGATTGGTTGTACAAGCTGTAGTA
 CACTTGCACACCCGGGCCCTGTGAGGGAGATCTGGGAGGTGAAGTTGATGGTGACACCATCTGAGGCCACCAT
 GGGGATCCCTCAGCATAATGGCTGCAGGGTACGGAAAGCCACACAGCCTCCTGTTCTGGATCATCCACTGGCC
 CTGAGTACACAGTCCGTTGTACTTCTGCCTCCTCAGTGCCTAGGCATCGAACCAGAGCGCCAAGCCGTAGTC
 CAGAGAGGGTACCCTGAGATGCCAGGAGCAGTGGGTACTGGGAGAGTAGTAAGTGGGGTAGTAGGGTGTACG
 GAGGAAGCCCTGTGTGTCAGCCGGCCCTCCAGTGTGAGGTTACCTGGCAGTCTGGAAGGCCACAGACTT
 CACTGAGAGCAGGAAAGGGTCATAGTAGCTATGCATGCCCTTTTTCCACACCACGGCCATGACGGAGCCCGA
 TGCCAGCACCTCCATCACAGGTTCTGGCGGCTGCACCCATAGACCGAGGTGATAAGTCTCTTCCAGGGG
 CCCAGCTGCGTCTGATACATCGCCACCCTGTCTCTGCAATCGACCCGGGTCCACTCCAGCCGCACCTTGATCAT
 GAGGTCCTTCGGGCCCTTGAGATGCCACAGGCAGCTTGTGGTCTGCTGGTCAGGCCCTTCAATGGGAGGAC
 CTGGCCTGGGTTACATAGCTGTAGCGATAACAGCCAGCGTGGAAATTCAGTACGACTATGTCGTTACACT
 GGCTTCCAGGATCACCAAGGCCTTCCGGGTCCACCTCATATTCGGTCTTATAGGAAGCCAGGGTTGAGCTGTT
 GGACAGTAGCTCATCCACCAGGAGCTCGCGCACTACTTCAGGGCTCAGGGTCAGTCGCTGGTACTCAGGGAT
 GTCAAGGATAAACAGAAAGCAGGTGAGGGGTCCCTCCCAAAGGAGTAGACAGAAGTGTAGTGTGTAGTA
 AGTACCAGGCGGGTGTGGCAACCAGTCTTGGAGCATCTTCTGGGCTTTGGCAGATTCAGTGGGAAAGC
 AATAGACTCCCGTCCGCCAGGTCTGGGAGAAATGACGGTTGAGCACCCGGAGGCTGCCAGAGTACACCTG
 GCTTACGGTCACTTCCGCTTTGTACCTAGGAAATACCAAAGCATGACCCCTGCTGAGACCAGCGCAGCCAA
 GACCAGCAACAGTGGCGTGAAGCGGACGTAGTCCCGGTTTTTCTCTTGGTGTTTTTTGGGGGCTTGAACCT
 CCCCCTAGCTCAGCAGTTCCTCTCCATCACCCGCATCGCCCTGACCATCAGCCGCTTGGGGGACCTCGGT
 GGTGGGCATCTGGTAGAACAGGGGAGCTGGAAACATCTCGGCATCTTCAAGAGTGGAAAGGTAGGTGCCGGG
 CCTGCACACAGGCCTGGAGGCCTCTGTTTATCCAGGCAAGGTCTTTCCACCCCAACTGGCCAGCTTAGGT
 TGGATCAATGGCCTGGAGCCATGGCTGGGGTGTCTGGCCCTGTCTCTTGTGGCCTGTGGCCCCAAGTTCCA
 TGGGCCTCTCTGTCAAGTCCAGGGCGACAATGAAACT

Фиг. 14

SEQ ID NO:8

Обратная комплементарная последовательность >gil194474097|reflNM_001130556.1|

трансмембранная протеаза *Rattus norvegicus*, серин 6 (TMPRSS6), mRNA

GCTTGGCCAACTGCTTTATTTCCGGAACAGACAGTGGGCCTCCAGTGAATGGCAGGGAGGGCCCTGTAGCAG
 GCAGAGCACAGCAGGCACCCGAGCTGAGGCTGCCCATGATTTGGCTTACGGTATGGCCCTACTTGGCAGT
 CTCAAGGGCTCTGACAGAGCCTTGATAGAGGCACCTTCTTTCTCGGATCCAGTTCCCCCTAGAGGCTTTTGC
 AAGGGGAAGGAATCTACTTTCCACAGACCTTGGAAACCAGCATCATTGCCACCAGACCCCCACCCAAAACA
 GCAGTAGGAGGGGAGAGGGGAAAGGACTAGAATAAGAAAGGGTTGGAAGTGAAGCCGAGCTGAGGCTAGCCC
 CTGGAGGCATCCTAACACCAGCTGACATCCTTCTCTGTACTGTCCCTGGGGTAGGCATGAGGGGACAGGCC
 TTAGCAGGGTCGCTCGCCACAGAATACTTGTGCCCTGGCTGGGTGGTCACTGGGCTCCTTGCAAACCAGTG
 GGCCTCCAGAGTCGCCCTGGCAGGCATCTTTCTTGGCCCTTGCGATAACCAGCACAGAGCATGCGTGGGGTCA
 CCTGGTAACGGTAGGCCTCATTGCACAGGTCCTGAGGGATCAGTTGCACATCCACCTTCTGAAGGGTGTCTGC
 TACCAGGACCACCTCTCGCTGGGCTCCCCAGCCTGTGATCCAGCAGTGCTGGCCTGGCTCAAAGAAGTGAG
 AGCGTGCGGGACAGCAGACGGGGCGCACGGTGGCCGAGTACACCACAGGGTGGTCCAGCTGCAGCAGGGCCA
 CGTCGTAGTCATGGCTGTCTCCTCATGATACGGGTGCAGGAACAGGCGGCTCACCTTGAAGGACACCTCGC
 CCGGCCAGCGTGAATTTCTGCCGCATCTTTCCAGAAACACGGTCCACAGCCTCGGGGAGGCCATGCTGTCTCT
 CCTGGAAGCAGTGAGCGGCTGTTATGACCCAGCGGTGAGCGATGAGAGCCCCCCCCACAGATGTGTGACCCCC
 GAATCTGGAGACTGGCCTGCCAGGGCCACTCACCTCCGAGGACATGGCCCCGCCACAATGCGGGCTGGAGG
 GGCCCTGGAGGCCACAGTCAAGTGTCTCCTCATCCGAGCCATCCCTGCAGTCTGCCTGCCCGTCACTCTCGG
 GGTGGGCTTCTTACACAGCTCCGGTCTCTCACTGGAAAGTGAATGTCCACAGGGCACTCCTTCTTGGC
 ACTGCTCTTCGTCGCTACCATTTGAGACAGTCGGGCTGCCGGTCAAGACTCTCGGCAGTGAGATGCACGTGC
 TGTCTCTTGGCACTGGAACATGGCTCTGCAGACACAGTTCCTCTCATCCAGGCGGTTGGGGCAGTCTTGA
 TTCCGTACAAGCAGGGACACACAATCCATTACAGAGCAGAGGAACCTCCAGGGCAGGGGTCGATTGGT
 TGTACAAGCTGTAGTACACTTGCACACCCGGGCTGTGAGGGAGATCTGGGAGGTGAAGTTGATGGTGATAC
 CATCCGAGGCCACCACGGGGATCCTCTCAGCATAAGTGGCTGCAGGGTACGGAAGCCACATAGCCTCCTGTTCT
 GGATATCCACTGGCCCTGAGTACATAGTAGGTTGTACTTCTGCCCTCAGTGCCTCAGTGCCTCAACCAGA
 GTGCCAAGCCACTGAGTCCAGAGAGGGAACCGTGAGATGCCAGGAGCAGTGGGTACTGGGCGAGTAGTAAGTGG
 GGTAGTAGGTTGTACGGAGGAAGCCCTGTGGATCCAGCCGGCCTCCAGGGTCAAGTTACCTGGCAGTCTCT
 GGAAGGCCACAGACTTCACTGAGAGCAGAAAAGGGTTCATAGAAGCTATGCAAGCCCTTCTTCCACACCACGG
 CCATGACAGAGCCCGACGCCAGCACCTCCATCACGGGTTCTTGGCGGCTGCACCCATAGACCGAGGTGATAA
 GTCTCTTCTCCAGGGGCCAGCTGCGTCGTACATCGCCACCTGTCTCTGCAATCAACCCGAGTCCACTCTA
 GCTGCACTTTGAGCATGAGGTCCTCGGGCCCTGCAGGTGCCACAGGCAGCTAGTGGTCTGCTGGTGGGGCC
 CCCTCAACCCGGAGGACCTGGCCCGGGTTCACGTAGCTGTAGCGGTAACAGCCCAGCGTGGAAATTCAGTACGA
 CTATGTCGTTACGCTGGCTTCTAGTATCACCCAGGCCTTCCGGGTCCACCTCATATTCGGTCTATAGGAAG
 CCAAGGCTGAGCTGTGGACAGTAGCTCACCCACCAGGAGCTCGCGCACACCTCAGGGCTCAGGGTCAGTC
 GCTGGTACTCGGGGATGTCAAGGATGAACCAGAAGAAGCAGATAAGGGGTCCCTCCCCAAAGGCCTAGATGG
 AACTGGAGTTGTAGTAAGTACCCAAGCGGGTGTGGCAACCAGCTCTTGGAAATCTTCTGGGCTTTGGCAG
 TTTCAAGTGCAGAAAGCAATAGACTCCCGTGGGCCAAGTCTGTGAAAAATGGCGGTTGAGCACCCGGAGGC
 TGCCAGAGTACACCTGGCTTATGGTCACTTCCGCCTGTACCCTAGGAAATACCAGAGCATGACTCCTGCCG
 AAGCCAACGCAGCCAAGACCAGCAACAGTGGTGTGAAGCGGACGTAGTCCCTGTCTTTTCTCTTGGCGTTTC
 TGGGGCCTTGAACACCCCTCTGGCTCTGCAGCTTCTCTCCATCACCTCCATCACCTTGACCACCAGCTG
 CTTGGGGAACCTCAGCGGTGGGCATCCTGGTAGAACAGGGGAGCTGGAACATCTTGGCATCTTCAAGAGTG
 GAAGGTAGGTGCTGGGCTGAACACAGGCCTGGAGGCCTCTGTTTATCCAGGCCAAGGTCTCTCCACCACA
 ACTGGCCAGCTTAGGTTGGATCAATAGCCTGGAACCATGACTGGGGTGTCTGGCCCTTGTCCCTCGTGGCCT
 GTGGCCCCAAGTTCCATGGGCCTCCTGTGAGTCCAGGACGGACAAT

Фиг. 15

SEQ ID NO:9

Обратная комплементарная последовательность >gil297260989|reflXM_001085203.2|

ПРЕДСКАЗАННАЯ: Масаса mulatta, трансмембранная протеаза, серин 6, вариант 3 транскрипта (TMPRSS6), mRNA

GAGGTGGGACCTGCTCTGCAGGGGGGCAGTTCCCTCAGGTCACCACTTGCTGGATCCAGCCGATCACACCTGT
GATGCGGGTGTAGACGCCGAAGTAGTTAGGCCGGCCACAGCCCAGGCCCCAGCTGACCAGCCCTGCCAGGAA
CCAGCGGCCACTGAGTGCCTTGCAATACCAGCGGACCACCCGAGTCACCCCTGGCAGGCATCCTTCTTGCCCTT
GCGGTAGCCGGCACAACAGCATGCGTGGCCTCACCTGGTAGCGATAGGCCCTCGCTGCACAGGTCTGTGGGAT
CAACTGCACGTCCACTTTCTGCAGAGCATTGCTGGTGGGGCCGCCCTTCGCGCAGGGCGCCCCAGCCAGTGAT
CCAGCAGTGCAGGCCGGGTTGAAAGAAAGTGGGAGCGCGCGGGCAGGCAGACTGGACGCACGGCGGGCCAGCG
CACCACCGGGTGGTTCGAGCTGCAACAGCGCCACGTCGTAGTCGTGGCTGTCCCTTTCGTGATACGGATGCAG
GAGTAGGCGGGCTCACCTTGAAGGACACCTCTCCAGGCCAGCGCGAGTTCTGCCACACCTTGCCAGGAAACAC
CGTCCACAGCGCCGGGGAGGCCATGCTGTCCCTGGAAAGCAATGGGCAGCTGTTATCACCCAGCGGTGAGC
GATGAGGGCGCCCCACAGATGTGTGACCCCGAACCTGGAGGCTGGCTGCCATGGCCACTCACCCCTCGGA
GGACACGGCCCCACCAACAATGCGACTGGAGGGGCCCTGGAGGCCACAGTCACAGTGCTGCTCGTCTGAGCC
GTCCCTGCAGTCGGGGCCGCCATCACACTGTGGGTTGGGCTTCTTTCACGCAGCTCTGGTCTCACACTGGAA
GGTGAATGTCCCGCAGGGCACCCCTTCCGGCACCGCTCTTCATCGCTGCCGTTGAGACAGTCAGGCTGCC
GTCACAGACCTTAAGCAGTGAGATGCACGTGCTGTCCCTTGGCACTGGAATGTGGCTCTGCAAAACGCAGTT
TCTCTCATCCAGGCCGTTGGGGCAGTCCCTGACCCCATCACAGGCAGGGACGCAGAGTCCGTTTACAGAGCA
GAGGAACCTCTCCAGGGCAGGGGTCCGACTGGTTGTACAAGCCATAGTGCACCCGCACACCAGGCCCTGTGAG
GGAGATCTGGGAGGTGAAATTGATGGTGATGCCGGCCGTGGCCACCACGGGGATCCTCTCGGCGTAAGGCTG
CAGGATGCGCAGGCCACACAGCCTCCTGTTCTGGATCGTCCACTGGCCCTGGGTGCACGGCAAATCATACTT
CTGCCCTCCGCAGTGCCTAGGCGTCAAACCAGAGGGCCAAAGCCGTAGTCCAGAGAGGGCACCGTGAGGTGCCA
GGAGCAGTGGGTTGGGGCGAGTAGTAGCTGGGGAAGTACGGGGTGCTGAGGACGCCCTGGGAGTCCAGCCT
GTCATCCAGCGTCAGGTTTACCTCGCAGGCCGGAAGACCACCGACTGCACGGAGAGCATAAAGGGGTGTA
GTAGCTGTGCAGGCCCTTCTTCCAGACCACCGCCATGATGGCCCCGATGCCAGGACTTCCACCACAGGCTC
CTGGCGGCTGCAGCCATAACCGAGGTGATGAGCCTTCTTCCAGGGGCCAGCCACGTACATACATGGCCAG
TCGGTCCCAGGACTCGGCCAGCGTCCACTCCAGCCGAGTTTACAGCATGAGGTCTTCGGGGCCCTGCAGGTG
CCACAGGCAGCTGGAGGCCAGGTGGTCCGCTCAGCCGGAGGACCTGACCCTGGCCCACGTAGCTGTA
GCGGTAACAACCCAGCGTGAATTCAGTGCAGCTATGCTTTTACACTGGCTTCTAGGATCACTAGGCCCTC
GGGGTCCACTTCGTACTCGGCCCTGTAGGGGACAGCCCGGAGCTGTTGACTGTGGACAGCAGCTCCTCCAC
CAGCAGTGCCTGCACCACCTCGGGGCTCAGCATCAGCCGGCGGTGCTCGGGGATTTGGAGAATGAACCAGAA
GAAGCAGGTGAGCGTCCCTCCCAAAGGAAATAGACGGAGCTGGAGTTGTAATAAGTCCCAGGCGGGTGTCT
GGCGATGAGCTCCTTGAGCATCTTCTGGGCTTTGGCGGTTTCACTGCGGAAGGCACTGGATTCCCGCGGGT
AAGATCCTGGGAGAAGTGGCGATTGAGCACGCGCAGGCTGCCTGAGTACACCTGGCTGACCGTCACTCCGC
CTTGTACCCTAGGAAATACCAGAGTAGCACCCCACTGAAGTCAGCACAACCAGGGTCAGCCACAGGGGCGC
CAGGCGGAGGTAGCCCCGGGCTTTTCTCTTGGAGTCCCTACGGGCCCTCGAACATCCCCTCTGGCTCCGCTT
CTCGCCATCACCTCCGTCCCCTGCCACCAGCCACCTGGGGGCCCTTGCCACAGGCATCCTG

Фиг. 16

SEQ ID NO:10

Обратная комплементарная последовательность >gil109094061|reflXM_001085319.11
 ПРЕДСКАЗАННАЯ: Масаса mulatta, трансмембранная протеаза, серин 6, вариант 4
 транскрипта (LOC696094), mRNA

TTGGATCAGGCAGCTTTTATCCAAAGGGCAGCTGAGCTCACCTGCCGGTGAGGGTCTGGGCTGTGAGGGGCC
 AGGTGGCAGGCAGGGGTGGGGCAAGGACSTTGGAGTCAGGGCTTCCCCACSTTTTTGGCTTACGGTGGCAG
 CCGGCCACSTGGCAGTCCCCGGGGTGTGAGGGTCCCCCTCCTATGGGGGCACCTTCCATTCCCAGATCCCA
 AGTTAGACCAGGGGCTTCCGAAGCTGGCATCTGCTCTCTAGAGGCAAGGCTGCCAAGCAGCCTCTGTACAG
 AGTGGGGCAGCTCAGACACTCTGGGGACGTAGAGCCAGCATTTCTGTGCTGAGCCACTTCTTGTCAAT
 AGGCAGCAGTGGAGGAAGGGGACAGAGGAGAGAGAATCGGGAGGCAGAAGGGCTGGGTGTGGGCTGGGTCC
 STAGGGGACGTCTTGACCCACAGTGTGGCCTCTCCATCCTCTGCCATCACTGGAGCAGACATCAGGG
 ACAAGACAAGATGACCCTTCTGCCACCACAGGGCTGCTCGCGCCCCCTCCCCCAGAATACTTGTCCCC
 CTGCTTGGCAATTGCCCTGGGCTCTGTAGTCCAAGAGGTGGGACCTGCTCTGCAGGGGGGCAGTTCCTCAG
 GTCACCACTTGTGGATCCAGCCGATCACACCTGTGATGCGGGTGTAGACGCCGAAGTAGTTAGGCCGGCCA
 CAGCCCAGGCCACAGCTGACCAGCCCTGCCAGGAACCAGCGCCACTGAGTGCTTGCATACCAGCGGACCA
 CCGAGTCACCCCTGGCAGGCATCTTCTTGGCCCTGCGGTAGCCGGCACACAGCATGCGTGGCGTCACTGG
 TAGCGATAGCCCTCGCTGCACAGGTCTGTGGGATCAACTGCACGTCCACTTCTGCAGAGCATTGCTGGT
 GGGCCGCTTTCGCGCAGGGCGCCCAGCCAGTGATCCAGCAGTGCAGGCCGGGTTCGAAGAAGTGGGAGCGC
 GCGGGCAGGCAGACTGGACGCACGGCGGCCGAGCGCACACCAGGGTGGTTCGAGCTGCAACAGCGCCAGTCCG
 TAGTCTGGCTGTCTCTCTCTGATACGGATGCAGGAGTAGGCGGCTCACCTTGAAGGACACCTCTCCAGGC
 CAGCGCAGTCTTGCACACCTTGCCAGGAACACCGTCCACAGCGCCGGGGAGGCCATGCTGTCTCTCTGG
 AAGCAATGGGCAGCTGTTATCACCCAGCGGTGAGCGATGAGGGCGCCCCACAGATGTGTGACCCCCGAACC
 TGGAGGTGGCCTGCCATGGCCACTCACCTCGGAGGACACGGCCCCACCAACAATGCGACTGGAGGGGCC
 TGGAGGCCACAGTCACAGTGTCTGCTGTGAGCCGTCCTGCAGTGGGGCCGCCATCACACTGTGGGTG
 GGCTTCTTACCGCAGCTTGGTCTCACACTGGAAGGTGAATGTCCCGCAGGGCACCCCTTCTTGGCAGCG
 TCTTCATCGCTGCCGTTGAGACAGTCAGGCTGCCGTCACAGACCTTAAGCAGTGAGATGCACGTGCTGTCC
 TCTTGGCACTGGAATGTGGCTTGCAACCGAGTTTCTCTCATCCAGGCCGTTGGGGCAGTCTTGAACCCCA
 TCACAGGCAGGGACGCAGAGTCCGTTTCACAGAGCAGAGGAACTCTCCAGGGCAGGGGTCCGACTGGTTGTAC
 AAGCCATAGTGACCCGCACACCAGGCCCTGTGAGGGAGATCTGGGAGGTGAAATGATGGTGTGCGCGCC
 GTGGCCACCACGGGGATCTCTCGGCGTAAGGCTGCAGGATGCGCAGGCCACACAGCCTCCTGTTCTGGATC
 GTCCACTGGCCCTGGGTGCACGGCAAATCATACTTCTGCCTCCGCACTGCGTAGGCGTCAAACCAGAGGGCC
 AAGCCGTAGTCCAGAGAGGGCACCGTGTAGGTGCCAGGAGCAGTGGGTTCGGGGCAGTAGTAGCTGGGGAAG
 TACGGGGTGTGAGGACGCCCTGGGAGTCCAGCCTGTTCATCCAGCGTCAAGTTTACCTCGCAGGCCCTGGAAG
 ACCACCGACTGCACGGAGAGCATAAAGGGGTGCTAGTAGCTGTGCAGGCCCTTCTTCCAGACCACCGCCATG
 ATGGCCCCCGATGCCAGGACTTCCACCACAGGCTCCTGGCGGCTGCAGCCATACACCGAGGTGATGAGCCTC
 TTCTCCAGGGGCCAGCCACGTCAATACATGGCCAGTCCGTTCCCGGCACCTCGGCCAGCGTCCACTCCAGCCGG
 AGTTTTCAGCATGAGGTCTTCCGGGGCCCTGCAGGTGCCACAGGCAGCTGGAGGCCAGGTGGTTCGGGTCCCTTC
 AGCCGGAGGACCTGACCTGGCCACGTAGCTGTAGCGTAACAACCCAGCGTGAATTCAGTGCAGCTATG
 TCTTTCACACTGGCTTCTAGGATCACTAGGCCCTCGGGTCCACTTCGTACTCGGCCCTGTAGGGGACAGCC
 GCCGAGCTGTGACTGTGGACAGCAGCTCCTCCACCAGCAGTGCCTGCACCACCTCGGGGCTCAGCATCAGC
 CGGCGGTGCTCGGGGATTTGGAGAATGAACCAGAAGAAGCAGGTGAGCGGTCCCTCCCCAAAGGAATAGACG
 GAGCTGGAGTTGTAATAAGTTCACAGGCGGGTGTGGCGATGAGCTCCTTGAGCATCTTCTGGGCTTTGGCG
 GTTTCAGTGCAGGAAGGCACTGGATTCCTGGCGGGTAAAGATCCTGGGAGAAGTGGCGATTGAGCACGCGCAGG
 CTGCCGTAGTACACCTGGCTGACCGTCACTCCGCTTGTACCTAGGAAATACCAGAGTAGCACCCCACT
 GAAGTCAGCACAACCAGGTCAGCCACAGGGGCGCCAGGCGGAGGTAGCCCCGGCTTTTCTCTTGGAGTCC
 TCACGGGCTCGAACATCCCTCTGGCTCCGCTTCTCGCCATCACCTCCGTCCCCCTGCCACCAGCCACC
 TGGGGGGCTTGGCCACAGGCATCCTTTAGAGTGAAGAGTAACAACATCAGCGGCAGTGACCGGAAGTG
 GGTGCCGAGACAGTTCACAGAGGAGCGAAGTGCATCTCAAGGCAGCTCACCCAGAGGGCAGGCACCAGAGC
 TGGACTGGGTGTGGCTCAAG

Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2