

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044245**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.04

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

(21) Номер заявки
201591707

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(54) КОМПОЗИЦИИ иРНК КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА C5 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/782,531; 61/837,399; 61/904,579;
61/912,777; 61/942,367**

(32) **2013.03.14; 2013.06.20; 2013.11.15;
2013.12.06; 2014.02.20**

(33) **US**

(43) **2016.03.31**

(86) **PCT/US2014/025882**

(87) **WO 2014/160129 2014.10.02**

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

(72) Изобретатель:
**Фитцджеральд Кевин, Батлер
Джеймс, Бетгенкорт Брайан,
Бородовский Анна, Кучиманчи
Сатиянараяна, Хариссе Клаус,
Манохаран Мутхиах, Майер Мартин,
Раджив Каллантхоттатхил Г., Фостер
Дональд (US)**

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

(56) EP-A1-1752536
CHENG LING-LI ET AL.: "[Effect of
C5-siRNA silencing receptor C5 on myocardial
ischemia injury in rats]", JOURNAL OF SOUTHERN
MEDICAL UNIVERSITY - NAN FANG YI
KE DA XUEBAO, NANFANG-YIKE-DAXUE
<GUANGZHOU>, CN, vol. 30, no. 6, 19 May
2010 (2010-05-19), pages 1486-1488, XP008170341,
ISSN: 1673-4254, abstract

WO-A2-2009108931
Anonymous: "C5 siRNA (h): sc-42848",
2012, page 1, XP55126933, Retrieved
from the Internet: URL: [http://datasheets.scbt.com/
sc-42848.pdf](http://datasheets.scbt.com/sc-42848.pdf) [retrieved on 2014-07-04] the whole
document

TANG KAI ET AL.: "Protective effect of C5
shRNA on myocardial ischemia-reperfusion injury
in", CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
AND PHARMACOLOGY, NRC RESEARCH
PRESS, CANADA, vol. 90, no. 10, 15
October 2012 (2012-10-15), pages 1394-1402,
XP008170044, ISSN: 0008-4212, DOI: 10.1139/
Y2012-114 [retrieved on 2012-10-15] page 1395,
right-hand column; figures 1-7

WO-A2-2009073809

WO-A2-2009111701

ANNA BORODOVSKY ET AL.:
"Development Of RNAi Therapeutics Targeting The
Complement Pathway", BLOOD, vol. 122, no. 21, 15
November 2013 (2013-11-15), - 10 December 2013
(2013-12-10), page 2471, XP055126934, US, ISSN:
0006-4971, the whole document

WO-A2-2004045543

WO-A2-2010048352

DATABASE EMBL [Online] 18 August
2010 (2010-08-18), "Sequence 43701 from
Patent EP2213738", XP002729257, retrieved from
EBI accession no. EM PAT:HD166985, Database
accession no. HD166985, the whole document

DATABASE EMBL [Online] 26 August
2010 (2010-08-26), "Sequence 935538 from
Patent EP2213738", XP002729258, retrieved from
EBI accession no. EM PAT:HH058823, Database
accession no. HH058823, the whole document

(57) Изобретение относится к иРНК, например двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (dsRNA), композициям, нацеленным на ген компонента комплемента C5, а также способам применения таких иРНК, например dsRNA, композициям для ингибирования экспрессии C5 и для лечения субъектов, страдающих заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например ночной пароксизмальной гемоглобинурией.

044245 B1

044245 B1

Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/782531, поданной 14 марта 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/837399, поданной 20 июня 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/904579, поданной 15 ноября 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/912777, поданной 6 декабря 2013 г. и предварительной заявке на патент США № 61/942367, поданной 20 февраля 2014 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых предварительных заявок на патенты, таким образом, 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 10 марта 2014 г., имеет название 121301-00520 SL.txt, и ее размер составляет 734486 байт.

Уровень техники

Комплемент был впервые обнаружен в 1890-х годах, когда было обнаружено способствование или "комплексное" уничтожение бактерий термостабильными антителами, присутствующими в нормальной сыворотке (Walport, M.J. (2001) *N Engl J Med.* 344:1058). Система комплемента состоит из более чем 30 белков, которые либо присутствуют в виде растворимых белков в крови, или присутствуют в виде белков, ассоциированных с мембраной. Активация комплемента приводит к последовательному каскаду ферментативных реакций, известных как пути активации комплемента, в результате чего формируются мощные анафилатоксины C3a и C5a, которые вызывают множество физиологических реакций, варьирующих от хемотаксии до апоптоза. Первоначально считалось, что комплемент играет важную роль во врожденном иммунитете, в результате чего устанавливается надежная и быстрая реакция против вторжения патогенных микроорганизмов. Тем не менее, в последнее время становится все более очевидным, что комплемент также играет важную роль в адаптивном иммунитете с участием Т- и В-клеток, которые помогают в ликвидации патогенных микроорганизмов (Dunkelberger J.R. и Song W.C. (2010) *Cell Res.* 20:34; Molina H., et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:3357), в поддержании иммунологической памяти, предотвращающей повторное вторжение патогенов, и участвует в многочисленных патологических состояниях человека (Qu, H., et al. (2009) *Mol Immunol.* 47:185; Wagner, E. и Frank M.M. (2010) *Nat Rev Drug Discov.* 9:43).

Активация комплемента, как известно, происходит по трем разным путям: альтернативному, классическому и лектиновому (фиг. 1) с участием белков, которые преимущественно существуют в виде неактивных зимогенов, которые затем последовательно отщепляются и активируются. Все пути активации комплемента ведут к отщеплению молекулы C5 с образованием анафилатоксина C5a и C5b, который впоследствии формирует терминальный комплекс комплемента (C5b-9). C5a оказывает преобладающую провоспалительную активность путем взаимодействия с рецептором C5aR (CD88) классического G-белка, а также с рецептором C5L2 (GPR77) белка, отличающегося от G-белка, экспрессируемых на различных иммунных и не иммунных клетках. C5b-9 вызывает цитолиз посредством формирования мембраноатакующего комплекса (MAC), при этом субъединицы литического MAC и растворимый C5b-9 обладают множеством не цитолитических иммунных функций. Эти два эффектора комплемента, C5a и C5b-9, образованные при отщеплении от C5, являются ключевыми компонентами системы комплемента, ответственные за распространение и/или инициирование патологии при различных заболеваниях, включая ночную пароксизмальную гемоглобинурию, ревматоидный артрит, травмы впоследствии ишемии и нейродегенеративные заболевания.

На сегодняшний день доступно только одно терапевтическое средство, нацеленное на C5-C5a компоненты, для лечения заболеваний, связанных с компонентом комплемента C5, которое представляет собой антитело к C5, экулизумаб (Soliris®). Хотя экулизумаб показал эффективность при лечении пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) и атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), и в настоящее время оценивается в клинических испытаниях для лечения дополнительных заболеваний, связанных с компонентом комплемента C5, терапия экулизумабом требует еженедельных инфузий высоких доз, с дальнейшими инфузиями раз в две недели, с ежегодной стоимостью приблизительно 400000 \$. Соответственно, существует потребность в данной области в альтернативной терапии и комбинированной терапии для субъектов, имеющих заболевание, связанное с компонентом комплемента C5.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) отщепление РНК-транскриптов гена C5. Ген C5 может находиться в пределах клетки, например, клетки в пределах субъекта, такого как человек. Настоящее изобретение также относится к способам и комбинированной терапии для лечения субъекта с нарушениями, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем ингибирования или снижения экспрессии гена C5, например, заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, такого как ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS) с помощью композиций иРНК, которые воздействуют на отщепление, опосредованное комплексом сайленсинга, индуцированным РНК (RISC), РНК-транскриптов гена C5 для ингибирования экспрессии гена C5.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающийся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из A-118320, A-118321, A-118316, A-118317, A-118332, A-118333, A-118396, A-118397, A-118386, A-118387, A-118312, A-118313, A-118324, A-118325, A-119324, A-119325, A-119332, A-119333, A-119328, A-119329, A-119322, A-119323, A-119324, A-119325, A-119334, A-119335, A-119330, A-119331, A-119326, A-119327, A-125167, A-125173, A-125647, A-125157, A-125173, и A-125127. В другом варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из последовательностей в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность AAGCAAGAUUUUUUAUAAUA (SEQ ID NO:62) и где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU (SEQ ID NO:113). В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, как описано ниже.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечному средству RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды смысловой цепи и практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами и где смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификации.

В одном варианте осуществления практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого дезокси-тимина (dT) нуклеотида. В другом варианте осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого дезокси-тимина (dT) нуклеотида. В другом варианте осуществления модифицированные нуклеотиды представляют собой короткую последовательность дезокси-тимин (dT) нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце. В еще одном варианте осуществления смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида, 2'-О-метил модифицированного нуклеотида, 2'-фтор модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида морфолино, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего основу не природного происхождения, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, и концевого нуклеотида, связанного с производным холестерина или бис-дециламидной группой додекановой кислоты.

В другом варианте осуществления модифицированные нуклеотиды содержат короткую последовательность 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида.

В одном варианте осуществления участок комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину. В другом варианте осуществления участок комплементарности составляет от 19 до 21 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления участок комплементарности составляет 19 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления каждая цепь составляет не более 30 нуклеотидов в длину.

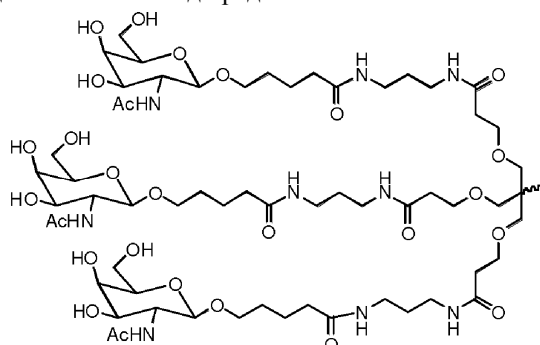
В одном варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 2 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, дополнительно содержит лиганд.

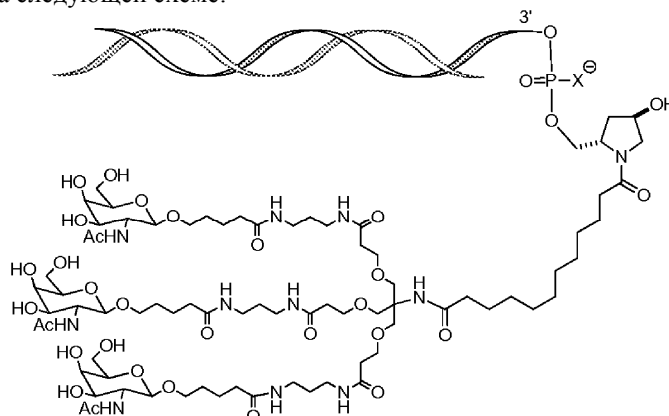
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи средства, представляющего собой dsRNA.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления участок комплементарности состоит из одной из антисмысловых последовательностей в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, выбрано из группы, состоящей из AD-58123, AD-58111, AD-58121, AD-58116, AD-58133, AD-58099, AD-58088, AD-58642, AD-58644, AD-58641, AD-58647, AD-58645, AD-58643, AD-58646, AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность AAGCAAGUAUUUUUAUAAUA (SEQ ID NO:62) и где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUUdTdT (SEQ ID NO:2899).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfauaL96 (SEQ ID NO:2876) и где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность usAfsUfuA-fuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT (SEQ ID NO:2889).

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -(X \text{ } X \text{ } X) \text{ } _i \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } -(Z \text{ } Z \text{ } Z) \text{ } _j \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -(X'X'X') \text{ } _k \text{ } -N_b \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_b \text{ } -(Z'Z'Z') \text{ } _l \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 5'$ (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 из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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 одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте 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.

В одном варианте осуществления k равняется 0; l равняется 0; k равняется 1; l равняется 1; как k , так и l равняется 0 или как k , так и l равняется 1.

В одном варианте осуществления XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y', и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

В одном варианте осуществления мотив Y'Y'Y' находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой цепи от 5'-конца.

В одном варианте осуществления Y' представляет собой 2'-О-метил.

В одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 5'$ (IIIa).

В другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } -Z \text{ } Z \text{ } Z \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_b \text{ } -Z'Z'Z' \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 5'$ (IIIb),

где каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5

модифицированных нуклеотидов.

В еще одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -X \text{ } X \text{ } X \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -X'X'X' \text{ } -N_b \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 5'$ (IIIc),

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

В другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIId):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -X \text{ } X \text{ } X \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } -Z \text{ } Z \text{ } Z \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -X'X'X' \text{ } -N_b \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_b \text{ } -Z'Z'Z' \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 5'$ (IIIId),

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

В одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 15-30 пар нуклеотидов.

В одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-23 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-25 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 23-27 пары нуклеотидов.

леотидов. В еще одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 19-21 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 21-23 пары нуклеотидов.

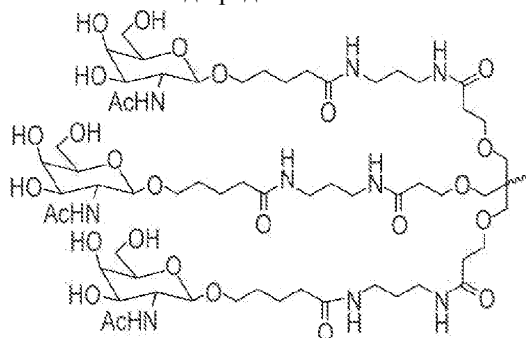
В одном варианте осуществления каждая цепь содержит 15-30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксиды, 2'-гидроксила и их комбинаций.

В другом варианте осуществления модификациями нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации.

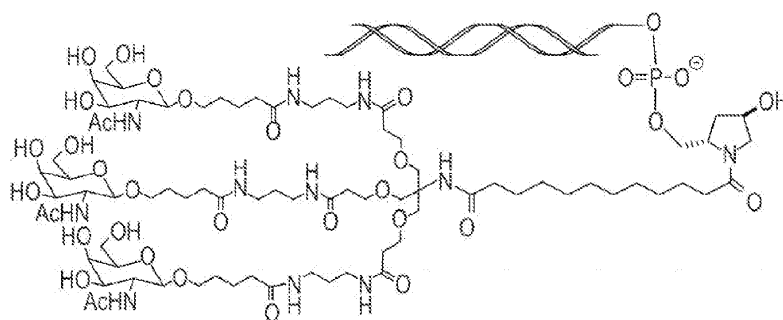
В одном варианте осуществления лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления лиганд прикреплен к 3'-концу смысловой цепи.

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



В одном варианте осуществления средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

В одном варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь. В другом варианте осуществления цепь представляет собой смысловую цепь.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

В одном варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь. В другом варианте осуществления цепь представляет собой смысловую цепь.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи.

В одном варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь.

В одном варианте осуществления пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса является парой оснований AU.

В одном варианте осуществления нуклеотиды Y имеют 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления нуклеотиды Y' имеют 2'-О-метил-модификацию.

В одном варианте осуществления $p' > 0$.

В одном варианте осуществления $p' = 2$.

В одном варианте осуществления $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, и выступающие нуклеотиды p' комплементарны целевой мРНК.

В другом варианте осуществления $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, и выступающие нуклеотиды p' не комплементарны целевой мРНК.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи.

В одном варианте осуществления все n_p' связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфотиоатных связей.

В одном варианте осуществления средство RNAi выбрано из группы средств RNAi, перечисленных в табл. 4, табл. 18, табл. 19 или табл. 23. В другом варианте осуществления средство RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-58123, AD-58111, AD-58121, AD-58116, AD-58133, AD-58099, AD-58088, AD-58642, AD-58644, AD-58641, AD-58647, AD-58645, AD-58643, AD-58646, AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, где указанное двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей компонент комплемента C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

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

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

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

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

каждый из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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 одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, где указанное двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей компонент комплемента C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

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

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

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

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

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

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

каждый из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, где указанное двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей компонент комплемента C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } - (X \text{ } X \text{ } X) \text{ } _i \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } - (Z \text{ } Z \text{ } Z) \text{ } _j \text{ } -N_a \text{ } - n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p' \text{ } -N_a' \text{ } - (X' \text{ } X' \text{ } X') \text{ } _k \text{ } -N_b' \text{ } -Y' \text{ } Y' \text{ } Y' \text{ } -N_b' \text{ } - (Z' \text{ } Z' \text{ } Z') \text{ } _l \text{ } -N_a' \text{ } - n_q' \text{ } 5'$ (III),

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

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

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

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

каждый из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

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

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, где указанное двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей компонент комплемента C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } - (X \text{ } X \text{ } X) \text{ } _i \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } - (Z \text{ } Z \text{ } Z) \text{ } _j \text{ } -N_a \text{ } - n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p' \text{ } -N_a' \text{ } - (X' \text{ } X' \text{ } X') \text{ } _k \text{ } -N_b' \text{ } -Y' \text{ } Y' \text{ } Y' \text{ } -N_b' \text{ } - (Z' \text{ } Z' \text{ } Z') \text{ } _l \text{ } -N_a' \text{ } - n_q' \text{ } 5'$ (III),

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

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

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

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

каждый из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

где смысловая цепь 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 предусматривает двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, где указанное двухцепочечное средство

RNAi содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей компонент комплемента C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{-} N_a \text{-} Y \text{ } Y \text{ } Y \text{-} N_a \text{-} n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p' \text{-} N_a' \text{-} Y'Y'Y' \text{-} N_a' \text{-} n_q' \text{ } 5'$ (IIIa),

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

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

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

каждый из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из $Y Y Y$ 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 цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

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

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечному средству RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификации, выбранные из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации и 2'-фтор модификации, где смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификации, выбранные из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации и 2'-фтор модификации, где антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В другом варианте осуществления каждая цепь содержит 19-30 нуклеотидов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке, содержащей средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, кодирующему по меньшей мере одну цепь средства, представляющего собой dsRNA, где средство, представляющее собой dsRNA, содержит участок комплементарности к по меньшей мере части мРНК, кодирующей компонент комплемента C5, где dsRNA составляет в длину 30 пар оснований или меньше, и где средство, представляющее собой dsRNA, нацелено на мРНК с целью отщепления.

В одном варианте осуществления участок комплементарности составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов в длину. В другом варианте осуществления участок комплементарности составляет 19-21 нуклеотида в длину. В другом варианте осуществления каждая цепь содержит 19-30 нуклеотидов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке, содержащей вектор по настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента C5, содержащей средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления средство RNAi вводят в не забуференном растворе.

В одном варианте осуществления не забуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

В одном варианте осуществления средство RNAi вводят в буферном растворе.

В одном варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию.

В другом варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей двухцепочечное средство RNAi по настоящему изобретению и липидный состав.

В одном варианте осуществления липидный состав включает LNP. В другом варианте осуществления липидный состав включает МСЗ.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей средство антисмыслового полинуклеотида, выбранного из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 19, 18, 20, 21 и 23.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей средство смыслового полинуклеотида, выбранного из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 19, 18, 20, 21 и 23.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к средству модифицированного антисмыслового полинуклеотида, выбранного из группы, состоящей из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 4, 6, 18, 19, 21 и 23.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к средству модифицированного смыслового полинуклеотида, выбранного из группы, состоящей из смысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 4, 6, 18, 19, 21 и 23.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, осуществляя тем самым лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, предотвращая тем самым по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающийся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 23, осуществляя тем самым лечение субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающийся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, предотвращая тем самым по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного средства RNAi, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицируемыми нуклеотидами, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими лигандами на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение.

В одном варианте осуществления практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого dT нуклеотида. В другом варианте осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида. В другом варианте осуществления модифицированные нуклеотиды представляют собой короткую последовательность дезокси-тимин (dT) нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце. В еще одном варианте осуществления смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

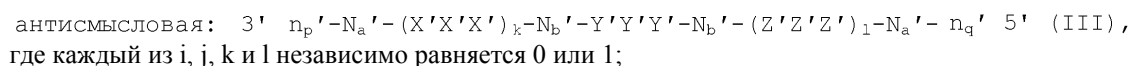
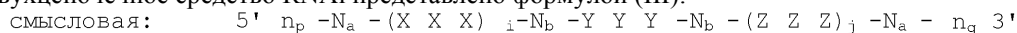
В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, которые включают введение субъекту профилактически эффективного количества двухцепочечного средства RNAi, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь конъюгирована с одним лигандом на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение.

В одном варианте осуществления практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого dT нуклеотида. В другом варианте осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида. В другом варианте осуществления модифицированные нуклеотиды представляют собой короткую последовательность дезокси-тимин (dT) нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце. В еще одном варианте осуществления смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство 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 из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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 одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

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

где смысловая цепь конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом; с помощью которого осуществляется лечение субъекта, при котором осуществляется лечение субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

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

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

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

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

каждый из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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 одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

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

где смысловая цепь конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом; с помощью которого предотвращается по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, тем самым предотвращая по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие.

В одном варианте осуществления введение dsRNA субъекту приводит к уменьшению внутрисосудистого гемолиза, стабилизации уровня гемоглобина и/или снижению скопления белка C5.

В одном варианте осуществления заболевание представляет собой заболевание, связанное с компонентом комплемента C5. В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, выбрано из группы, состоящей из ночной пароксизмальной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (RA), синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS), болезни плотного осадка (DDD), оптиконевромиелита (NMO), мультифокальной моторной нейропатии (MMN), рассеянного склероза (MS); дегенерации желтого пятна (например, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдрома, включающего гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP-синдром); пурпуры тромбоцитарной тромбоцитопенической (ТТР); спонтанной потери плода; пауци-иммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении, болезни холодных агглютининов, дерматомиозита буллезного пемфигоида, связанного с Шига-подобным токсином E. coli гемолитико-уремического синдрома, С3-нефропатии, васкулита, связанного с антителами к цитоплазме нейтрофилов; реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальными и сосудистыми механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, аллогенной трансплантации, сепсиса, заболевания коронарной артерии, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, сепсиса, связанного с системным воспалительным ответом, септического шока, травмы спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистых нарушений, миокардита, цереброваскулярного нарушения, перифериче-

ских сосудистых нарушений, реноваскулярной гипертензии, нарушений брыжеечных/кишечных сосудов, васкулита, нефрита Шенлейна-Геноха, васкулита, связанного с системной красной волчанкой, васкулита, связанного с ревматоидным артритом, васкулита, связанного с иммунными комплексами, болезни Такаса, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, вращательной атерэктомии, перепончатой нефропатии, синдрома Гийена-Барре и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA). В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH). В еще одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента комплемента C5 на фрагменты C5a и C5b. В другом варианте осуществления антитело к компоненту комплемента C5 представляет собой экулизумаб.

В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту менингококковой вакцины.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 600 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В еще одном варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают плазмоферез или замещение плазмы у субъекта. В одном таком варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 600 мг или в дозе менее чем приблизительно 300 мг.

В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают инфузию плазмы субъекту. В одном таком варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 7 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту путем внутривенной инфузии.

В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту один раз в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в месяц.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, и экулизумаб вводят субъекту подкожно. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, и экулизумаб вводят субъекту одновременно.

В одном варианте осуществления сначала вводят субъекту средство, представляющее собой dsRNA, в период времени, достаточный для снижения уровня компонента комплемента C5 у субъекта, и затем вводят экулизумаб в дозе менее чем приблизительно 600 мг.

В одном варианте осуществления уровень компонента комплемента C5 у субъекта снижен на по меньшей мере приблизительно 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят в дозе приблизительно 100-500 мг.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают измерение уровней гемоглобина и/или LDH у субъекта.

В одном варианте осуществления dsRNA конъюгирована с лигандом.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи dsRNA.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5; и поддержание клетки, полученной на стадии (а) в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена C5, тем самым ингибируя экспрессию гена C5 в клетке.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающийся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23; и поддержание клетки, полученной на стадии (а) в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена C5, тем самым ингибируя экспрессию гена C5 в клетке.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, включающими приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, содержащую участок комплементарности, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими лигандами на 3'-конце; и поддержание клетки, полученной на первой стадии в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена C5, тем самым ингибируя экспрессию гена C5 в клетке.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого dT нуклеотида. В другом варианте осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида. В другом варианте осуществления модифицированные нуклеотиды представляют собой короткую последовательность дезокси-тимин (dT) нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце. В одном варианте осуществления ан-

тисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце. В еще одном варианте осуществления смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, содержащим смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -(X \text{ } X \text{ } X) \text{ } i \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } -(Z \text{ } Z \text{ } Z) \text{ } j \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

антисмысловая: $3' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -(X' \text{ } X' \text{ } X') \text{ } k \text{ } -N_b \text{ } -Y' \text{ } Y' \text{ } Y' \text{ } -N_b \text{ } -(Z' \text{ } Z' \text{ } Z') \text{ } l \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 5'$ (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 из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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 одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

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

где смысловая цепь конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом; и поддержание клетки, полученной на стадии (a) в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена C5, тем самым ингибируя экспрессию гена C5 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления, субъект-человек страдает от заболевания, связанного с компонентом комплемента C5.

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, выбрано из группы, состоящей из ночной пароксизмальной гемоглинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (RA), синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS), болезни плотного осадка (DDD), оптиконевромиелита (NMO), мультифокальной моторной нейропатии (MMN), рассеянного склероза (MS); дегенерации желтого пятна (например, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдрома, включающего гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP-синдром); пурпуры тромботической тромбоцитопенической (ТТР); спонтанной потери плода; пауци-иммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении, болезни холодных агглютининов, дерматомиозита буллезного пемфигоида, связанного с Шига-подобным токсином E. coli гемолитико-уремического синдрома, С3-нефропатии, васкулита, связанного с антителами к цитоплазме нейтрофилов; реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальными и сосудистыми механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, аллогенной трансплантации, сепсиса, заболевания коронарной артерии, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, сепсиса, связанного с системным воспалительным ответом, септического шока, травмы спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии (АНА), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистых нарушений, миокардита, цереброваскулярного нарушения, периферических сосудистых нарушений, реноваскулярной гипертензии, нарушений брыжеечных/кишечных сосудов, васкулита, нефрита Шенлейна-Геноха, васкулита, связанного с системной красной волчанкой, васкулита, связанного с ревматоидным артритом, васкулита, связанного с иммунными комплексами, болезни Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, вращательной атерэктомии, перепончатой нефропатии, синдрома Гийена-Барре и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA). В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой

ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH). В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с антителом к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента комплемента C5 на фрагменты C5a и C5b.

В одном варианте осуществления, антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой экулизумаб.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с менингококковой вакциной.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В еще одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 600 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают плазмаферез или замещение плазмы у субъекта. В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 600 мг. В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают инфузию плазмы субъекту. В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

В другом варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом в дозе от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 7 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту путем внутривенной инфузии. В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В другом варианте осуществления клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, один раз в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в неделю. В другом варианте осуществления клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, два раза в месяц.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, и экулизумаб вводят субъекту подкожно. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, и экулизумаб вводят субъекту одновременно.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, и экулизумабом одновременно.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту сначала в период времени, достаточный для снижения уровня компонента комплемента C5 у субъекта, а экулизумаб вводят затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг.

В одном варианте осуществления уровень компонента комплемента C5 у субъекта снижается на по меньшей мере приблизительно 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят в дозе приблизительно 100-500 мг.

В одном варианте осуществления сначала клетку приводят в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, в период времени, достаточный для снижения уровня компонента комплемента C5 в клетке, и затем клетку приводят в контакт с экулизумабом в дозе менее чем приблизительно 600 мг.

В одном варианте осуществления уровень компонента комплемента C5 в клетке снижается на по меньшей мере приблизительно 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%.

В одном варианте осуществления клетку приводят в контакт с экулизумабом в дозе приблизительно 100-500 мг/кг.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии C5 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, тем самым ингибируя экспрессию C5 у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии C5 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающийся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, тем самым ингибируя экспрессию C5 у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими лигандами на 3'-конце, тем самым ингибируя экспрессию гена C5 у субъекта.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение.

В одном варианте осуществления практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого dT нуклеотида. В другом варианте осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, выбранными из группы, состоящей из 2'-О-метил модификации, 2'-фтор модификации и 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида. В другом варианте осуществления модифицированные нуклеотиды представляют собой короткую последовательность дезокси-тимин (dT) нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце. В еще одном варианте осуществления смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии C5 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C5, где каждая цепь составляет в длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{ n}_p \text{ -N}_a \text{ - (X X X)}_i \text{ -N}_b \text{ -Y Y Y -N}_b \text{ - (Z Z Z)}_j \text{ -N}_a \text{ - n}_q \text{ 3}'$

антисмысловая: $3' \text{ n}_p' \text{ -N}_a' \text{ - (X'X'X')}_k \text{ -N}_b' \text{ -Y'Y'Y' -N}_b' \text{ - (Z'Z'Z')}_l \text{ -N}_a' \text{ - n}_q' \text{ 5}'$ (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 из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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 одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

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

где смысловая цепь конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, тем самым ингибируя экспрессию C5 у субъекта.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают введение субъекту антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления, антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой экулизумаб.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента комплемента C5 на фрагменты C5a и C5b.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту менингококковой вакцины.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 600 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В другом варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В еще одном варианте осуществления возраст субъекта меньше чем 18 лет и экулизумаб вводят субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают плазмоферез или замещение плазмы у субъекта. В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 600 мг. В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают инфузию плазмы субъекту. В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 7 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту путем внутривенной инфузии. В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту один раз в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в месяц.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, и экулизумаб вводят субъекту подкожно. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, и экулизумаб вводят субъекту одновременно.

В одном варианте осуществления сначала вводят субъекту средство, представляющее собой dsRNA, в период времени, достаточный для снижения уровня компонента комплемента C5 у субъекта, и затем вводят экулизумаб в дозе менее чем приблизительно 600 мг.

В одном варианте осуществления уровень компонента комплемента C5 у субъекта снижается на по меньшей мере приблизительно 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%.

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят в дозе приблизительно 100-500 мг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, конъюгировано с лигандом.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи средства, представляющего собой dsRNA.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение трех путей комплемента: альтернативного, классического и лектинового.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий процентную долю компонента комплемента C5, оставшуюся у мышей линии C57BL/6 после разовой дозы 10 мг/кг указанных иРНК.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий процентную долю компонента комплемента C5, оставшуюся у мышей линии C57BL/6 после разовой дозы 10 мг/кг указанных иРНК.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий процентную долю компонента комплемента C5, оставшуюся у мышей линии C57BL/6 через 48 ч после разовой дозы 10 мг/кг указанных иРНК.

Фиг. 5А представляет собой график, показывающий процентную долю гемолиза, оставшуюся в дни 4 и 7 у крыс после разового подкожного введения AD-58642 в дозе 2,5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

На фиг. 5В представлены данные вестерн-блоттинга, показывающие количество компонента комплемента C5, оставшееся на день 7 у крыс после разового подкожного введения AD-58642 в дозе 2,5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

Фиг. 6А и 6В представляют собой графики, показывающие процентную долю компонента комплемента C5, оставшуюся у мышей линии C57BL/6 через 5 дней после разовой дозы AD-58642 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

Фиг. 7А и 7В представляют собой графики, показывающие процентную долю гемолиза, оставшуюся на 5-й день у мышей линии C57BL/6 после разовой дозы AD-58642 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

На фиг. 8 представлены данные вестерн-блоттинга, показывающие количество компонента комплемента C5, оставшееся на день 5 у мышей линии C57BL/6 после разовой дозы AD-58642 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

Фиг. 9 представляет собой график, показывающий количество белка компонента комплемента C5, оставшееся на день 5 и 9 в сыворотке мышей после разовой дозы AD-58641 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в ходе анализа показан в виде пунктирной линии.

Фиг. 10 представляет собой график, показывающий количество белка компонента комплемента C5, оставшееся на день 8 в сыворотке мышей после введения AD-58641 в дни 0, 1, 2, и 3 в дозе 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг или 2,5 мг/кг. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в ходе анализа показан в виде пунктирной линии.

На фиг. 11А и 11В показана эффективность и кумулятивный эффект повторного введения соединения AD-58641 у крыс. Фиг. 11А представляет собой график, показывающий гемолитическую активность, сохранившуюся в сыворотке крыс на день 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25 и 32 после повторного введения в дозе 2,5 мг/кг/доза или 5,0 мг/кг/доза, q2w ×3 (два раза в неделю в течение 3 недель). На фиг. 11В представлены данные вестерн-блоттинга, показывающие количество белка компонента комплемента C5, оставшегося в сыворотке животных.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий количество белка компонента комплемента C5 в сыворотке макаков-крабоедов в различные моменты времени до, во время и после двух циклов подкожного введения AD-58641 в дозе 2,5 мг/кг или 5 мг/кг каждый третий день в количестве восьми доз. Уровни белка C5 приводили к среднему из трех образцов до введения препарата.

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий процентную долю гемолиза, оставшуюся в сыворотке макаков-крабоедов в различные моменты времени до, во время и после двух циклов подкожного введения AD-58641 в дозе 2,5 мг/кг или 5 мг/кг каждый третий день в количестве восьми доз. Процентную долю гемолиза рассчитывали по отношению максимального гемолиза к фоновому гемолизу в контрольных образцах.

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий процентную долю белка компонента комплемента C5, оставшуюся на день 5 в сыворотке мышей линии C57BL/6 после разовой дозы 1 мг/кг указанных иРНК.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий процентную долю белка компонента комплемента C5, оставшуюся на день 5 в сыворотке мышей линии C57BL/6 после разовой дозы 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг или 2,0 мг/кг указанных иРНК.

Фиг. 16 представляет собой график, показывающий процентную долю белка компонента комплемента C5, оставшуюся в сыворотке мышей линии C57BL/6 на день 6, 13, 20, 27 и 34 после разовой дозы 1 мг/кг указанных иРНК.

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий процентную долю гемолиза, оставшуюся в сыворотке крыс в различные моменты времени после введения дозы 5 мг/кг указанных соединений в день 0, 4 и 7.

На фиг. 18А показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Homo sapiens* (SEQ ID NO:1); на фиг. 18В показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Macaaca mulatta* (SEQ ID NO:2); на фиг. 18С показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Mus musculus* (SEQ ID NO:3); на фиг. 18D показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO:4); на фиг. 18Е показано обратное дополнение SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:5); на фиг. 18Е показано обратное дополнение SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO: 6); на фиг. 18С показано обратное дополнение SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:7); и на фиг. 18Н показано обратное дополнение SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO:8).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к средствам, представляющим собой иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) отщепление РНК-транскриптов гена компонента комплемента C5.

иРНК по настоящему изобретения содержат цепь РНК (антисмысловую цепь), содержащую участок, составляющий приблизительно 30 нуклеотидов или менее в длину, например, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов в длину, при этом участок, по сути, комплементарен по меньшей мере части транскрипта мРНК гена C5. Применение этих иРНК обеспечивает целевое разрушение мРНК гена C5 у млекопитающих. Очень низкие дозы иРНК C5, в частности, могут специфически и эффективно опосредовать интерференцию РНК (RNAi), что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена C5. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что иРНК, нацеленные на C5, могут опосредовать RNAi *in vitro* и *in vivo*, что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена C5. Таким образом, способы и композиции, включающие эти иРНК, полезны при лечении субъекта,

у которого снижение уровня и/или активности белка C5 окажет благоприятное воздействие, например, субъекта, страдающего заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, таким как ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH).

Настоящее изобретение также относится к способам и комбинированной терапии для лечения субъекта с нарушением, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем ингибирования или снижения экспрессии гена C5, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, такого как ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS) с помощью композиций иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) отщепление РНК-транскриптов гена компонента комплемента C5.

Настоящее изобретение также относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома, например, гемолиза, у субъекта, страдающего нарушением, при котором ингибирование или снижение экспрессии гена C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, такого как ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS). Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) отщепление РНК-транскриптов гена компонента комплемента C5. Ген C5 может находиться в пределах клетки, например, клетки в пределах субъекта, такого как человек.

Комбинированная терапия по настоящему изобретению включает введение субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, средства RNAi по настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к компоненту комплемента C5, например, экулизумаба.

Комбинированные терапии по настоящему изобретению снижают уровень C5 у субъекта (например, приблизительно на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или приблизительно 99%) путем нацеливания на мРНК C5 средства iRNA по настоящему изобретению и, соответственно, позволяют снизить требуемое терапевтически (или профилактически) эффективное количество экулизумаба при лечении субъекта, тем самым уменьшают расходы на лечение и позволяют применять более легкие и более удобные способы введения экулизумаба, такие как подкожное введение.

Нижеследующее подробное описание раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих иРНК, для ингибирования и экспрессии гена C5, а также композиции, применения и способы лечения субъектов, страдающих заболеваниями или нарушениями, при которых ингибирование и/или снижение экспрессии этого гена окажет благоприятное воздействие.

I. Определения.

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

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов статьи. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

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.

Применяемый в данном документе "компонент комплемента C5", используемый взаимозаменяемо с выражением "C5", относится к хорошо известному гену и полипептиду, также известному в данной области техники как C5A, C3- и PZP-подобный белок, содержащий домен альфа-2-макроглобулина, аналог анафилотоксина C5a, гемолитический комплемент (Hc) и единица комплемента C5. Последовательность транскрипта мРНК C5 человека можно найти, например, в GenBank, № GI: 38016946 (NM_001735.2; SEQ ID NO:1). Последовательность мРНК C5 макака можно найти, например, в GenBank, № GI: 297270262 (XM_001095750.2; SEQ ID NO:2). Последовательность мРНК C5 мыши можно найти, например, в GenBank, № GI: 291575171 (NM_010406.2; SEQ ID NO:3). Последовательность мРНК C5 крысы можно найти, например, в GenBank, № GI: 392346248 (XM_345342.4; SEQ ID NO:4). Дополнительные примеры последовательностей мРНК C5 легко доступны в публичных базах данных, например, GenBank.

Выражение "C5", применяемое в данном документе, также относится к встречающимся в природе вариациям последовательностей ДНК гена C5, таким как однонуклеотидный полиморфизм в гене C5. Были определены многочисленные SNP в гене C5 и могут быть найдены, например, в dbSNP NCBI (см., например, ncbi.nlm.nih.gov/snp). Не ограничивающие примеры SNP в гене C5 можно найти в dbSNP NCBI, номера доступа rs121909588 и rs121909587.

Применяемая в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена C5, в

том числе к мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления целевая часть последовательности будет, по меньшей мере, достаточно длинной, чтобы служить в качестве подложки для иРНК-направленного отщепления на или вблизи этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся при транскрипции гена C5.

Целевая последовательность может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов в длину, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину. Например, целевая последовательность может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 нуклеотидов в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

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

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако, будет понятно, что выражение "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, который подробнее описан ниже, или имитирующий нуклеотид заменяющий фрагмент (см, например, табл. 2). 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 dsRNA, описанных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любой точке олигонуклеотида могут быть замещены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначного спаривания оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении.

Выражения "иРНК", "средство RNAi", "средство, представляющее собой иРНК", "средство РНК-интерференции", применяемые в данном документе взаимозаменяемо, означают средство, которое содержит РНК в том значении, в котором это выражение описано в данном документе, и которое опосредует нацеленное отщепление РНК-транскрипта через путь РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). иРНК направляет специфичное в отношении последовательности разрушение мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (RNAi). иРНК модулирует, например, ингибирует экспрессию C5 в клетке, например, клетке субъекта, как, например, субъекта-млекопитающего.

В одном варианте осуществления средство RNAi по настоящему изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК C5, с направлением отщепления целевой РНК. Не желая привязываться к теории, считают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе III типа фермент, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (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 цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК 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 одноцепочечной РНК (siRNA), образованной внутри клетки, и которая способствует образованию RISC-комплекса с осуществлением сайленсинга целевого гена, т.е. гена C5. Соответственно, выражение "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

В другом варианте осуществления средство RNAi может быть одноцепочечной siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные средства RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью в комплексе RISC, который затем отщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Строение и испытание одноцепочечных 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 одноцепочечной siRNA, которая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al., (2012) Cell 150: 883-894.

В другом варианте осуществления "иРНК" для применения в композициях, применениях и способах по настоящему изобретению является двухцепочечной РНК и в данном документе ее называют "двухцепочечным средством RNAi", "молекулой двухцепочечной РНК (dsRNA)", "средством, представляющим собой dsRNA" или "dsRNA". Выражение "dsRNA" означает комплекс молекул рибонуклеиновых кислот с дуплексной структурой, содержащий две встречно-параллельные и, по сути, комплементарные цепи нуклеиновых кислот, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию по отношению к целевой РНК, т.е. гену C5. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению двухцепочечная РНК (dsRNA) запускает расщепление целевой РНК, например, мРНК через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

В общем, большинство нуклеотидов каждой цепи молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, применяемое в данном описании, "средство RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство 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 применяются в молекуле типа siRNA, охвачены выражением "средство RNAi" в контексте данного описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, при которой возможно специфичное разрушению желаемой целевой РНК через путь RISC и может составлять от приблизительно 9 до 36 пар оснований в длину, например, приблизительно 15-30 пар оснований в длину, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или пар оснований в длину, например, приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, когда две цепи являются частью одной большей молекулы и, следовательно, соединены непрерываемой цепью нуклеотидов от 3'-конца одной цепи до 5'-конца соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединяющую цепь РНК, называют "шпилькой петли". Шпилька петли может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления шпилька петли может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов.

В тех случаях, когда две, по сути, комплементарные цепи dsRNA содержат отдельные молекулы РНК, эти молекулы не обязательно могут быть соединены ковалентно. В тех случаях, когда две цепи соединены ковалентно способом, отличным от непрерываемой цепи нуклеотидов от 3'-конца одной цепи до 5'-конца соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединяющую структуру называют "линкером". Цепи РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований является количеством нуклеотидов в самой короткой цепи dsRNA минус любые выступы, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступов.

В одном варианте осуществления средство RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК C5, направляя отщепление целевой РНК. Не желая привязываться к теории, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе III типа фермент, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (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 цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188).

Применяемое в данном документе выражение "нуклеотидный выступ" относится к по меньшей мере одному неспаренному нуклеотиду, который выпячивается из дуплексной структуры иРНК, например, dsRNA. Например, когда 3'-конец одной цепи dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой цепи или vice versa, существует нуклеотидный выступ. dsRNA может содержать выступ по меньшей мере одного нук-

леотида; альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять или более нуклеотидов. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезокси-нуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может находиться на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах, либо антисмысловой, или смысловой цепи dsRNA.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая цепь dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько нуклеотидов выступа замещаются нуклеозид-тиофосфатом.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухцепочечного средства RNAi нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухцепочечной по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на любом конце молекулы. Средства RNAi по настоящему изобретению включают средства RNAi с нуклеотидными выступами на одном конце (т.е. средства с одним выступом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступами на обоих концах.

Выражение "антисмысловая цепь" или "направляющая цепь" означает цепь иРНК, например, dsRNA, которая включает участок, который, по сути, комплементарен целевой последовательности, например, мРНК C5. Применяемое в данном документе выражение "участок комплементарности" относится к участку антисмысловой цепи, который, по сути, комплементарен последовательности, например целевой последовательности, например, последовательности нуклеотидов, C5, как определено в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, несовпадения могут присутствовать во внутренних или концевых участках молекулы. Как правило, наиболее приемлемые несовпадения располагаются в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца иРНК.

Выражение "смысловая цепь" или "пассажирская цепь", применяемое в данном документе, означает цепь иРНК, которая включает участок, который, по сути, комплементарен участку антисмысловой цепи, в том значении, в котором это выражение описано в данном документе.

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

Применяемое в данном документе, и если не указано иное, выражение "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 (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, которые могут встречаться в организме. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для анализа комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в пределах иРНК, например, в пределах dsRNA, описанных в данном документе, включают спаренные основания олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащие первую нуклеотидную последовательность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащую вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут быть отнесены к "полностью комплементарным" по отношению друг к другу в данном документе. 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 они могут образовывать одну или несколько, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя способность к гибридизации при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена через путь RISC. Однако, когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько од-

ноцепочечных выступов, то такие выступы не будут считаться несовпадениями 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, применяемые 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.

Выражения "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по сути, комплементарный" в данном документе можно применять по отношению к совпадению оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью dsRNA или между антисмысловой цепью средства, представляющего собой иРНК, и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

Применяемый в данном документе полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), означает полинуклеотид, который, по сути, комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей C5). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК C5 если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей C5.

В общем, большинство нуклеотидов каждой цепи являются рибонуклеотидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, "иРНК" может включать рибонуклеотиды с химической модификацией. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в области техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле иРНК, охвачены выражением "иРНК" в контексте данных описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечную молекулу антисмысловой РНК, которая ингибирует целевую мРНК с помощью механизма ингибирующего действия антисмысловых РНК. Молекула одноцепочечной антисмысловой РНК комплементарна последовательности в целевой мРНК. Одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом при спаривании оснований с мРНК и физически препятствуя механизму трансляции, см. Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355. Молекула одноцепочечной антисмысловой РНК может составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину и иметь последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одноцепочечной антисмысловой РНК может содержать последовательность, которая представляет собой по меньшей мере приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

Выражение "липидная наночастица" или "LNP" относится к пузырьку, содержащему липидный слой, заключающий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, иРНК или плазида, из которой транскрибируется иРНК. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Применяемый в данном документе "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая приматов (таких как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), не-приматов (таких как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птиц (например, утка или гусь). В одном варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, подвергаемый лечению или диагностике заболевания, нарушения или состояния, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие; человек, имеющий риск развития заболевания, нарушения или состояния, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие; человек, переносящий заболевание, нарушение или состояние, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие; и/или человек, подвергаемый лечению заболевания, нарушения или состояния, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, как описано в данном документе.

Применяемые в данном документе выражения "осуществлять лечение" или "лечение" относятся к полезному или желаемому результату, включая без ограничения ослаблению или облегчению одного или нескольких симптомов, связанных с нежелательной активацией пути комплемента (например, гемолиза и/или хронического воспаления); уменьшению степени нежелательной активации пути комплемента; стабилизации (т.е. без ухудшения) состояния хронического воспаления и/или гемолиза; облегчению или временному ослаблению нежелательной активации пути комплемента (например, хронического воспа-

ния и/или гемолиза), что либо установлено, либо не установлено. "Лечение" также может означать продление жизни по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

Выражение "ниже" в контексте уровня компонента комплемента C5 у субъекта, или маркера заболевания, или симптома относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может быть на, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более и, предпочтительно, вплоть до уровня, принятого в пределах нормального для человека без такого нарушения.

Применяемое в данном документе "предотвращение" или "осуществление профилактики", используемое в отношении заболевания, нарушения или его состояния, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, относится к снижению вероятности того, что у субъекта будет развиваться симптом, связанный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптом нежелательной активации комплемента, например, хроническое воспаление, гемолиз и/или тромбоз. Вероятность развития тромбоза снижается, например, когда у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска к развитию тромбоза, либо не развивается тромбоз, или тромбоз развивается в меньшей степени тяжести по отношению к популяции, имеющей те же факторы риска и не получающей лечение, как описано в данном документе. Неспособность развития заболевания, нарушения или состояния, или снижение развития симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере на приблизительно 10% по клинически принятой шкале для этого заболевания или нарушения), или демонстрация запаздывающих симптомов с опозданием (например, дни, недели, месяца или года) считается эффективным предотвращением.

Применяемое в данном документе выражение "болезнь, связанная с компонентом комплемента C5" представляет собой заболевание или нарушение, которое вызвано или связано с активацией комплемента. Такие заболевания, как правило, связаны с воспалением и/или активацией иммунной системы, например, лизисом, опосредованным атакующим мембрану комплексом, анафилаксией и/или гемолизом. Неограничивающие примеры заболеваний, связанных с компонентом комплемента C5, включают ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), астму, ревматоидный артрит (RA), синдром антифосфолипидных антител, волчаночный нефрит, ишемически-реперфузионное повреждение, типичный или инфекционный гемолитико-уремический синдром (tHUS), болезнь плотного осадка (DDD), оптиконевромиелит (NMO), мультифокальную моторную нейропатию (MMN), рассеянный склероз (MS); дегенерацию желтого пятна (например, связанная с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдром, включающий гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP-синдром); пурпуру тромбоцитическую тромбоцитопеническую (TTP); спонтанную потерю плода; пауци-иммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; преэклампсию, черепно-мозговую травму, миастению, болезнь холодových агглютининов, дерматомиозит буллезный пемфигоид, связанный с Шига-подобным токсином E. coli гемолитико-уремический синдром, С3-нефропатию, васкулит, связанный с антителами к цитоплазме нейтрофилов (например, гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как гранулематоз Вегенера), синдром Черджа-Стросс и микроскопический полиангиит); реакции отторжения трансплантата, вызванные гуморальными и сосудистыми механизмами, дисфункцию трансплантата, инфаркт миокарда (например, повреждение тканей и ишемия при инфаркте миокарда), аллогенную трансплантацию, сепсис (например, неблагоприятный исход сепсиса), заболевания коронарной артерии, дерматомиозит, болезнь Грейвса, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, сепсис, связанный с системным воспалительным ответом, септический шок, травма спинного мозга, гломерулонефрит, тиреонит Хашимото, диабет I типа, псориаз, пузырьчатку, аутоиммунную гемолитическую анемию (AIHA), ITP, синдром Гудпасчера, болезнь Дегоса, антифосфолипидный синдром (APS), катастрофический APS (CAPS), сердечно-сосудистые нарушения, миокардит, цереброваскулярные нарушения, периферические (например, опорно-двигательного аппарата) сосудистые нарушения, реноваскулярную гипертензию, нарушения брыжеечных/кишечных сосудов, васкулит, нефрит Шенлейна-Геноха, васкулит, связанный с системной красной волчанкой, васкулит, связанный с ревматоидным артритом, васкулит, связанный с иммунными комплексами, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь Кавасаки (артериит), венозную газовую эмболию (VGE) и рестеноз после установки стента, вращательную атерэктомия, перепончатую нефропатию, синдром Гийена-Барре и чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology* 41:147-152; публикация патента США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH). PNH может быть классической PNH или PNH в условиях синдрома недостаточности другого костного мозга и/или миелодиспластического синдрома (MDS), например, цитопении. В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

II. иРНК по изобретению.

Настоящее изобретение относится к иРНК, ингибирующим экспрессию гена компонента комплемента C5. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена C5 в клетке, например, клетке субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH. dsRNA содержит антисмысловую цепь, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена C5. Участок комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или менее в длину (например, приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или менее в длину). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген C5, иРНК ингибирует экспрессию гена C5 (например, гена C5 человека, примата, отличного от примата или птицы) по меньшей мере на приблизительно 10%, что оценивали с помощью, например, PCR или анализа на основе разветвленной ДНК (bdNA), или анализом на основе белков, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методов вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизованы с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будут применять. Одна цепь dsRNA (антисмысловая цепь) содержит участок комплементарности, который, по сути, является комплементарным, и, как правило, полностью комплементарный целевой последовательности. Целевая последовательность может быть получена из последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена C5. Другая цепь (смысловая цепь) содержит участок, который является комплементарным антисмысловой цепи, при этом две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в данном документе и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде комплементарных себе участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, вместо того, чтобы располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, дуплексная структура содержит от 15 до 30 пар оснований в длину, например, в пределах 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично, участок комплементарности целевой последовательности составляет в пределах 15 и 30 нуклеотидов в длину, например, в пределах 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 нуклеотидов в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 20 нуклеотидов в длину, или от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину. В общем, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно в данной области техники, dsRNA с длиной более, чем приблизительно 21-23 нуклеотидов в длину, могут служить субстратами для Dicer. Как также будет понятно обычному специалисту, участок РНК, представляющий собой цель для отщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. Где это уместно, "частью" мРНК-мишени является непрерывная последовательность целевой мРНК достаточной длины, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного отщепления (т.е. отщепление через путь RISC).

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексный участок является основной функциональной частью dsRNA, например, дуплексный участок от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления до того момента, пока участок подвергается обработке в функциональный дуплекс из, например, 15-30 пар оснований, что направляет желаемую РНК для отщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок больше, чем 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляют собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, приме-

няемое для нацеливания на экспрессию C5, не образуется в целевой клетке путем расщепления большей dsRNA.

dsRNA, описанная в данном документе, может дополнительно включать один или несколько одноцепочечных выступов нуклеотидов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступ, могут обладать неожиданно высокими ингибирующими свойствами по отношению к их аналогам с тупыми концами. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может находиться на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах, либо антисмысловой, или смысловой цепи dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, как описывается ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, таких как коммерчески доступные у, например, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения иРНК по настоящему изобретению можно получать с применением двухэтапной процедуры. Во-первых, отдельные цепи молекулы двухцепочечной РНК получают по отдельности. Затем составные цепи отжигают. Отдельные цепи соединения siRNA можно получать с применением синтеза в жидкой фазе или твердофазного органического синтеза, или обоих. Органический синтез имеет преимущество в том, что можно легко получать олигонуклеотидные цепи, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды. Одноцепочечные олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением синтеза в жидкой фазе или твердофазного органического синтеза, или обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидных последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая цепь выбрана из группы последовательностей, представленной в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, и антисмысловая цепь, соответствующая смысловой цепи, выбрана из группы последовательностей из любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей, по сути, комплементарна последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена C5. Таким образом, в этом аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, а второй олигонуклеотид описан как антисмысловая цепь, соответствующая смысловой цепи, в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

Следует понимать, что хотя некоторые из последовательностей в табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23 описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, указанных в табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, которые не являются модифицированными или конъюгированными, и/или модифицированы и/или конъюгированы иначе, чем описано в данном документе.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из приблизительно 20 и 23 пар оснований, например, 21 пара оснований, были расценены как особенно эффективные в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, было обнаружено, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). В вариантах осуществления, описанных выше, в силу характера олигонуклеотидных последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, описанные в данном документе dsRNA могут содержать по меньшей мере одну цепь длиной в 21 нуклеотид минимально. Разумно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, минус только несколько нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть одинаково эффективны по сравнению с dsRNAs, описанными выше. Следовательно, dsRNA, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена C5 не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования в сравнении с dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются в пределах объема по настоящему изобретению.

Кроме того, РНК, представленные в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, идентифицируют сайт(ы) в C5-транскрипте, который восприимчив к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно описаны иРНК, которые нацелены на один из этих сайтов. Применимо к данному документу, говорят, что иРНК нацелена на конкретный сайт транскрипта РНК, если иРНК способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая иРНК, как правило, будет содержать по меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, прилегающего к выбранной последовательности в гене C5.

В то время как целевая последовательность, как правило, составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину, существует большое разнообразие в пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направления расщепления любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, обеспечивают руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" данного размера (в качестве не лимитирующего примера, 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, в кремнии), размещены на последовательности целевой РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Перемещая постепенно "окно" последовательности одного нуклеотида выше или ниже начального положения целевой последовательности, может быть идентифицирована следующая потенциальная целевая последовательность, пока полный набор возможных последовательностей не определен для любого данного целевого выбранного размера. Этот способ в сочетании с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, как описано в данном документе, или как известно в данной области техники) для идентификации тех последовательностей, которые действуют оптимально, может идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании со средством, представляющим собой иРНК, опосредуют лучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, в то время как последовательности идентифицированы, например, в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23 представлены эффективные целевые последовательности, предполагается, что дальнейшая оптимизация эффективности ингибирования может быть осуществлена путем постепенного "перемещением окна" одного нуклеотида выше или ниже заданных последовательностей для идентификации последовательностей с одинаковыми или улучшенными характеристиками ингибирования.

Кроме того, предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, дополнительную оптимизацию можно достичь путем систематического либо добавления, или удаления нуклеотидов с образованием более длинных или более коротких последовательностей и проверки тех последовательностей, образованных в результате перемещения окна более длинного или более короткого размера вверх или вниз по целевой РНК с этой точки. Опять же, присоединение данного подхода к образованию новых целей у кандидатов с тестированием эффективности иРНК на основе тех целевых последовательностей в анализе ингибирования, известными в данной области техники и/или как описано в данном документе, может привести к дальнейшему повышению эффективности ингибирования. В продолжение, такие оптимизированные последовательности можно корректировать путем, например, введения модифицированных нуклеотидов, как описано в данном документе или как известно в данной области техники, добавлением или изменением выступа или другими модификациями, известными в данной области техники и/или описанных в данном документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, увеличение стабильности в сыворотке или периода полувыведения из кровотока, увеличение термостабильности, улучшение трансмембранной доставки, нацеливание на конкретное положение или тип клетки, увеличение взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, увеличение высвобождения из эндосома) в качестве ингибитора экспрессии.

иРНК, как описано в данном документе, может содержать одно или несколько несовпадений с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления иРНК, как описано в данном документе, содержит не более чем 3 несовпадения. Если антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область несовпадения находилась не в центре участка комплементарности. Если антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы несовпадение было ограничено в пределах последних 5 нуклеотидов от либо 5'-, или 3'-конца участка комплементарности. Например, для средства, представляющего собой иРНК, состоящего из 23 нуклеотидов, цепь, комплементарная участку гена C5, как правило, не содержит каких-либо несовпадений в пределах 13 центральных нуклеотидов. Описанные в данном документе способы или способы, известные в данной области техники, можно применять для определения является ли иРНК, содержащая несовпадение с целевой последовательностью, эффективной в ингибировании экспрессии гена C5. Рассмотрение эффективности иРНК с несовпадением в ингибировании экспрессии гена C5 является важным, особенно если конкретный участок комплементарности в гене C5, как известно, имеет изменение полиморфной последовательности в популяции.

III. Модифицированные иРНК по изобретению.

В одном варианте осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, dsRNA, является химически модифицированной для повышения стабильности или других полезных характеристик. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения практически все из нуклеотидов иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все из нуклеотидов иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. иРНК по настоящему изобретению, в которых "практически все нуклеотиды модифицированы" являются в значи-

тельной степени, но не полностью модифицированными и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области техники, такими как те, которые описаны в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк, США, которая включена в данное описание посредством ссылки. Модификации включают, например, модификации концов, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгация, перевернутые связи) или 3'-концевые модификации (сопряжение, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи, и т.д.); модификации оснований, например, замещение стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару с расширенным набором партнеров, удаление оснований (абазические нуклеотиды), или сопряженные основания; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положение) или замещение сахара; и/или остовные модификации, включая модификации или замещения фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений, представляющих собой иРНК, применяемые в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или межнуклеозидные связи не природного происхождения. РНК, содержащие модифицированные остовы включают, среди прочего, те, которые не содержат атом фосфора в остова. В контексте данного описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в их межнуклеозидном остова, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК будет содержать атом фосфора в ее межнуклеозидном остова.

Остовы модифицированных РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метиловые и другие алкил фосфонаты, включая 3'-алкилен фосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-амино фосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их 2'-5'-связанные аналоги, а также те, полярность которых инвертируется, где соседние пары нуклеозидных единиц связаны через 3'-5'- с 5'-3'- или 2'-5'- с 5'-2'-. Также включают различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №№ 3687808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029 и патент США № RE39464, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Остовы модифицированной РНК, которые не включают атом фосфора, представляют собой остовы, которые образуются межнуклеозидными связями коротких алкильных или циклоалкильных цепей, смешанными межнуклеозидными связями гетероатомов и алкильных или циклоалкильных цепей, или межнуклеозидными связями одной или нескольких более коротких гетероатомных или гетероциклических цепей. Они включают те, которые имеют морфолино-связи (формируются частично из части нуклеозида, представляющей собой сахар); силоксановые остовы; сульфид, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетиловые и тиоформацетиловые остовы; метилен-формацетиловые и тиоформацетиловые остовы; алкен-содержащие остовы; сульфаматные остовы; метилен-имино и метилен-гидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, включающие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5034506, 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437 и 5,677,439, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие РНК-миметики для применения в иРНК, в которой и связь сахара, и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных единиц, заменяются новыми группами. Единицы оснований поддерживают в течение гибридизации с целевым соединением соответствующей нуклеиновой кислоты. Одно из таких олигомерных соединений, РНК-миметик, которое продемонстрировало прекрасные характеристики гибридизации, называют пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA, остов сахара в РНК замещают амид-содержащим остова, в частности, аминоэтилглициновым остова. Азотистые основания сохраняют и связывают прямо или косвенно с атомами азота аза-группы амидной части остова. Иллюстративные патенты США, которые описывают получение соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082, 5,714,331, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в иРНК по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоат-

ными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, 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 метиленовый (метилимно) или остов ММ], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [где родной фосфодиэфирный остов представлен как $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, описанные в данном документе, имеют структуру морфолино-остова, как в вышеупомянутом патенте США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных фрагментов, представляющих собой сахара. иРНК например, dsRNA, описанные в данном документе, могут включать один из следующих заместителей в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C₁-C₁₀-алкилом или C₂-C₁₀-алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m равняется от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA включают один из следующих заместителей в положении 2': C₁-C₁₀ низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, О-алкарил либо О-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино-, поли алкиламино-, замещенный силил, группа расщепления РНК, "репортерная" группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств иРНК, или группа для улучшения фармакодинамических свойства иРНК, и другие заместители, обладающие подобными свойствами. В некоторых вариантах 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-алкокси-группу. Другая иллюстративная модификация представляет собой 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 данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Похожие модификации можно осуществить в других положениях РНК из числа иРНК, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-конце нуклеотида, или в 2'-5'-связанных dsRNA и 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также может иметь миметики сахара, такие как фрагменты циклобутила на месте сахара пентофуранозил. Иллюстративные патенты США, которые описывают получение таких структур модифицированного сахара включают без ограничения патенты США №№ 4981957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633 и 5700920, некоторые из которых, как правило, признают настоящую заявку. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в данный документ посредством ссылки.

иРНК также может включать модификации или замещения азотистого основания (часто называемого в данной области техники просто как "основание"). Применяемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" азотистые основания включают пуриновые основания аденина (A) и гуанина (G), и пиримидиновые основания тимина (T), цитозина (C) и урацила (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидроксицитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкиловые 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 анал и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные соединения урацила и цитозина, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные азотистые основания включают те, которые описаны в патенте США № 3687808, которые описаны в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; которые описаны в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J.L., ed. John Wiley & Sons, 1990, которые описаны Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613 и которые описаны 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 азотистых оснований особенно полезны для увеличения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропилиурацил и 5-пропилилцитозин. Замещения 5-метилцитозина продемонстрировали увеличение стабильности дуплекса нуклеиновой кислоты при 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 иллюстративными замещениями оснований, еще более предпочтительно в комбинации с модификацией сахара 2'-O-метоксиэтил.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение некоторых из выше указанных модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований включают без ограничения указанные выше патенты США №№ 3687808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066;

5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672 и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа иРНК также могут быть модифицированы с включением одной или нескольких замкнутых нуклеиновых кислот (LNA). Замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий фрагмент модифицированной рибозы, где фрагмент рибозы содержит дополнительный мост, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно "замыкает" рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Добавление замкнутых нуклеиновых кислот в siRNA продемонстрировало повышение стабильности siRNA в сыворотке и снижение эффектов не целевого действия (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, которые описывают получение нуклеотидов с замкнутыми нуклеиновыми кислотами, включают без ограничения следующие: патенты США №№ 6268490, 6670461, 6794499, 6998484, 7053207, 7084125 и 7399845, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциальные стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипропиол (Нур-С6-ННAc), N-(капроил-4-гидроксипропиол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипропиол (Нур-ННAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил) - 4-гидроксипропиол (Нур-С6-амино), 2-докосаноил-уридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и др. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации РСТ № WO 2011/005861.

А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы, по изобретению.

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухцепочечные средства RNAi по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в заявке РСТ/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которой включено в данный документ посредством ссылки.

Как показано в данном документе и в предварительной заявке № 61/561710 или заявке РСТ № РСТ/US2012/065691, превосходные результаты могут быть получены путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь средства RNAi, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства RNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство RNAi, к примеру смысловая нить, может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc. Полученные в результате средства RNAi характеризуются превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая цепь двухцепочечного средства RNAi полностью модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления по меньшей мере одной цепи средства RNAi или рядом с ним, тогда активность средства RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает двухцепочечные средства RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена компонента комплемента C5 (C5)) *in vivo*. Средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь средства RNAi может варьироваться в длину от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая цепь может составлять от 14 до 30 нуклеотидов в длину, от 17 до 30 нуклеотидов в длину, от 25 до 30 нуклеотидов в длину, от 27 до 30 нуклеотидов в длину, от 17 до 23 нуклеотидов в длину, от 17 до 21 нуклеотида в длину, от 17 до 19 нуклеотидов в длину, от 19 до 25 нуклеотидов в длину, от 19 до 23 нуклеотидов в длину, от 19 до 21 нуклеотида в длину, от 21 до 25 нуклеотидов в длину или от 21 до 23 нуклеотидов в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют двухцепочечный РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство RNAi." Дуплексный участок средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, дуплексный участок может составлять 14-30 пар нуклеотидов в длину, 17-30 пар нуклеотидов в длину, 27-30 пар нуклеотидов в длину, 17-23 пары нуклеотидов в длину, 17-21 пара нуклеотидов в длину, 17-19 пар нуклеотидов в длину, 19-25 пар нуклеотидов в длину, 19-23 пары нуклеотидов в длину, 19-21 пара нуклеотидов в длину, 21-25 пар нуклеотидов в длину или 21-23 пары нуклеотидов в длину. В другом примере дуплексный участок выбран из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления средство RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может составлять 1-6 нуклеотидов в длину, например, 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Выступы могут быть результатом того, что

одна нить длиннее другой, или того, что две нити одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая цепи 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 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 (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, ТТ может быть выступающей последовательностью для любого конца на любой цепи. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступы смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей средства RNAi могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий(ие) участок(и) содержит (содержат) два нуклеотида с фосфотиоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте осуществления выступ присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует у антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует у смысловой цепи.

Средство RNAi может содержать только один выступ, который может усиливать интерферирующую активность RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, одноцепочечный выступ может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой цепи. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или 3'-конце смысловой цепи) или *vice versa*. Как правило, антисмысловая цепь RNAi имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не желая быть связанными теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и выступ с 3'-конца антисмысловой цепи способствуют включению направляющей цепи в RISC-процесс.

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

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

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи. В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, между концевыми тремя нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-O-метилом или 3'-фтором, например, при чередующемся мотиве. Необязательно средство RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc₃).

В одном варианте осуществления средства RNAi содержит смысловую и антисмысловую цепь, где смысловая цепь составляет 25-30 нуклеотидных остатков в длину, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), позиции с 1 до 23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеоти-

дов; антисмысловая цепь составляет 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в позициях, спаренных с позициями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи представляет собой неспаренный со смысловой цепью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотида являются неспаренными со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой цепью, тем самым образуя 5'-одноцепочечный выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой цепи, при этом смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь достаточно комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой цепи в длину для уменьшения экспрессии целевого гена при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов происходит в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

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

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства RNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь средства 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 цепи или рядом с ним.

Для средства RNAi с дуплексным участком, составляющим 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи находится обычно приблизительно в 10, 11 и 12 положении 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 цепи, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи или отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка RNAi от 5'-конца.

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

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления цепи или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланкирующей модификацией. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части цепи, который отделен от мотива в сайте расщепления той же цепи 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 отличными. 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 цепи, антисмысловая цепь средства RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Данная антисмысловая цепь может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи средства RNAi обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи средства RNAi обычно не включает первый один или первые два спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

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

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

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, могут быть модифицированы. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или различной модификацией, которая может 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 остова.

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 цепи. Модификация может встречаться в двухцепочечном участке, в одноцепочечном участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухцепочечном участке РНК или может встречаться только в одноцепочечном участке РНК. Например, модификация фосфотиоата в несвязанном положении O 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 цепи, или может встречаться в двухцепочечном и одноцепочечном участках, в частности на конце. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Это может быть возможно, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступы или для включения модифицированных нуклеотидов или нуклеотидных заместителей в одноцепочечные выступы, например, в 5'- или 3'-выступ или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступе 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'-дезоксидефтор-(2'-F) или 2'-O-метил-модифицированных вместо рибозного сахара азотистого основания, и модификации фосфатной группы, например, модификации фосфотиоата. Выступы могут не быть гомологичными с целевой последовательностью.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-дезоксидефтор-, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Цепи могут содержать несколько модификаций. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-O-метилом или 2'-фтором.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой цепи и ан-

тисмысловой цепи. Эти две модификации могут быть 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями или другими.

В одном варианте осуществления N_a и/или N_b имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", применяемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной цепи. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один на каждые два нуклеотида, или один на 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 "АВАВА-ВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАА-АВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. 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 смысловых цепи или антисмысловых цепи может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.д.

В одном варианте осуществления средство RNAi по настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловых цепи, сдвинутый относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловых цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловых цепи соответствует модифицированной другой группой нуклеотидов антисмысловых цепи и vice versa. Например, при спаривании смысловых цепи с антисмысловой цепью в дуплекс dsRNA чередующийся мотив в смысловых цепи может начинаться с "АВАВАВ" от 5'-3'-концу цепи, а чередующийся мотив в антисмысловых цепи может начинаться с "ВАВАВА" от 5'-3'-концу цепи в дуплексном участке. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловых цепи может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'-3'-концу цепи, а чередующийся мотив в антисмысловых цепи может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'-3'-концу цепи в дуплексном участке, так что между смысловых цепью и антисмысловых цепью присутствует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В одном варианте осуществления средство RNAi первоначально содержит паттерн чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловых цепи и первоначально имеет сдвиг в отношении паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловых цепи, т.е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловых цепью с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловых цепи и vice versa. 1 положение в смысловых цепи может начинаться с 2'-F-модификации, а 1 положение в антисмысловых цепи может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

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

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "... N_a YYY N_b ...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, а " N_a " и " N_b " представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "YYY", 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 RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловых цепи, или антисмысловых цепи, или обеих цепей в любом положении в цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловых цепи и/или антисмысловых цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне в смысловых цепи и/или антисмысловых цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне.

Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловых цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловых цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловых цепи может характеризоваться сдвигом относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи антисмысловых цепи. В одном варианте осуществления средства осуществления двухцепочечное средство RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце и две фос-

фототиоатных межнуклеотидных связи на 3'-конце, и смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеотидных связи либо на 5'-конце, или 3'-конце.

В одном варианте осуществления RNAi имеет модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной 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 фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, может быть по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Эти концевые три нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи и/или 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи и между концевыми тремя нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство RNAi может дополнительно иметь две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство RNAi содержит несовпадение (несовпадения) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Несовпадение может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать исходя из их склонности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, наиболее простым подходом является изучение пар по отдельным парам оснований, хотя можно также выполнить анализ следующей соседней пары или подобный). В плане содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (которые описаны в других частях данного документа), более предпочтительны, чем канонические типы спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальные основания, более предпочтительны, чем канонические типы спаривания.

В одном варианте осуществления средство RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранную из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и несовпадающих пар, например, неканонических или отличных от канонических типов спаривания или типов спаривания, которые включают универсальные основания, для содействия диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

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

В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокси-тимин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокси-тимин (dT). В одном варианте осуществления присутствует короткая последовательность дезокси-тимин нуклеотидов, например, два dT нуклеотида на 3'-конце смысловой и/или антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где каждый из i и j независимо равняется 0 или 1;

каждый из r и q независимо равняется 0-6;

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

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

каждый из n_p и n_q независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

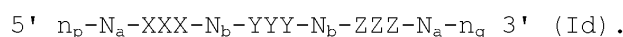
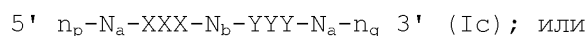
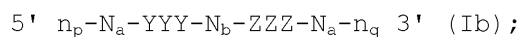
где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию; и

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

В одном варианте осуществления N_a и/или N_b имеет модификации чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, если средство 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 цепи, 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.

В одном варианте 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 цепь, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



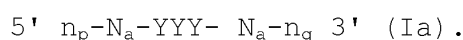
В тех случаях, когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20,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

В тех случаях, когда смысловая цепь 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. Каждая из N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

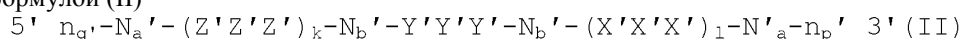
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

В других вариантах осуществления i равняется 0, а j равняется 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой



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

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой цепи 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;

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

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

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

где N_b' и Y' имеют неодинаковую модификацию; и

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

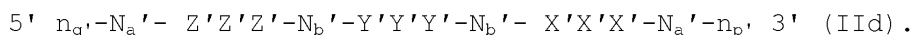
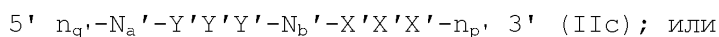
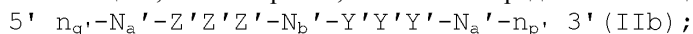
В одном варианте осуществления N_a' и/или N_b' имеет модификации чередующегося паттерна.

Мотив $Y'Y'Y'$ находится в сайте расщепления антисмысловой цепи или рядом с ним. Например, если средство 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 цепи, 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.

В одном варианте осуществления в мотиве $Y'Y'Y'$ все нуклеотиды 2'-ОМе-модифицированы.

В одном варианте 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 цепь, таким образом, может быть представлена следующими формулами:

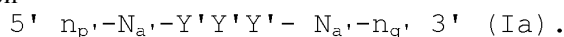


В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (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. Каждая из N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (IId), каждая из 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. Каждая из 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.

В других вариантах осуществления k равняется 0, а l равняется 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой



В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIa), каждая из 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 одинаковым или отличным от остальных.

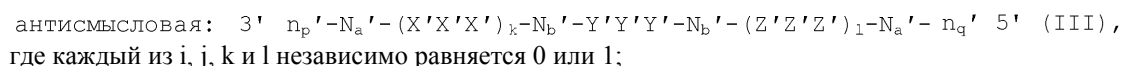
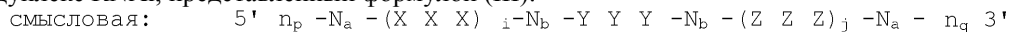
Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо может быть модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.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

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в 9, 10 и 11 положениях цепи, 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 цепь 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'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 цепи, 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 цепь может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая цепь, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой цепью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId), соответственно.

Соответственно, средства RNAi для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая цепь содержит от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс RNAi, представленный 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 из N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

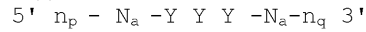
каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

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

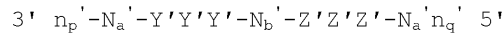
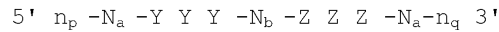
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

В одном варианте 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. В другом варианте 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 равняется 0; или как k , так и l равняется 1.

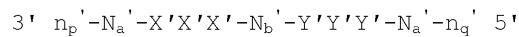
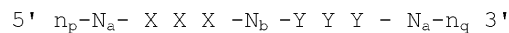
Иллюстративные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

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

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

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIc), каждый из 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 из N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIId), каждый из 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 из 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 содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

В одном варианте 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'.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIId), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIId), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом

посредством фосфотиоатной связи. В еще одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (III_d), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, n_p' > 0, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (III_d), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, n_p' > 0, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

В одном варианте осуществления средство RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), 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.

В одном варианте осуществления средство RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), 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.

В одном варианте осуществления два средства RNAi, представленные формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), 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 по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США № 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, полное содержание которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки.

Как описано более подробно ниже, средство RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет прикреплен к модифицированной субъединице средства RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства, представляющего собой dsRNA, можно замещать другими фрагментами, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был замещен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией-замещением рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т.е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может быть полностью насыщенной кольцевой системой или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают: (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к 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" (TAP) в некоторых вариантах осуществления означает входящий в кольцо атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), 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, цикличе-

ский 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 RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидина, пиразолинила, пиразолидинила, 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.

В определенных конкретных вариантах осуществления средством RNAi для применения в способах по настоящему изобретению является средство, выбранное из группы, состоящей из средств, перечисленных в любой из табл. 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами.

Другая модификация РНК из числа иРНК по настоящему изобретению включает химическое связывание с одним или несколькими лигандами РНК, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение иРНК. Такие фрагменты включают без ограничения липидные группы, такие как фрагмент холестерина (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556), холевую кислоту (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берилл-S-тримитлиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) или адамантан-уксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237), или октадециламин или фрагмент гексиламино-карбонилноксистерина (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства, представляющего собой иРНК, в которое он введен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать вещество, встречающееся в природе, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновая кислота) или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-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 может 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, витамин А, биотин или RGD-пептид, или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, тексафирин, сапфирин),

полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминокеркапто, 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 печеночная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную глюкозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. 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, представляющего собой иРНК, 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, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к иРНК, как описано в данном документе, и действует как фармакокинетический модулятор (РК-модулятор). РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохоловую кислоту, диалкил-глицериды, диацил-глицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остоле, 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 для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональность, такие как те, полученные из присоединения связывающей молекулы на олигонуклеотиде (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид можно непосредственно подвергать взаимодействию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы с наличием любой из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связующий фрагмент, присоединенный к нему.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать удобным и обычным способом путем хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems (Foster City, Calif). Дополнительно или альтернативно могут быть применены любые другие средства для такого синтеза, известные в данной области техники. Также известно применение аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды и лиганд-молекула, несущая последовательность-специфические связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотида или нуклеозида, или предшественников нуклеотид- или нуклеозид-конъюгата, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотида или нуклеозид-конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих лиганд, отличный от нуклеозида.

При применении предшественников нуклеотид-конъюгата, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез последовательность-специфических связанных нуклеозидов, как правило, завершают и молекулу лиганда затем подвергают взаимодействию со связывающим фрагментом с образованием лиганд-конъюгированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из лиганд-нуклеозид конъюгатов, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно применяются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Конъюгаты липидов.

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. 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 (а) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (б) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (с) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Липидный лиганд можно применять для ингибирования, например, регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, менее вероятно, что липид или липидный лиганд, который связывается с HSA более сильно, будет целенаправленно воздействовать на почки и, таким образом, менее вероятно, что он будет выводиться из организма. Липид или липидный лиганд, которые связываются с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

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

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

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Таковые являются особенно пригодными для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток.

Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые целевыми клетками, например, печеночными клетками. Также включены НАС и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку.

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. Прикрепление пептида и пептидомиметиков к средствам, представляющим собой иРНК, может повлиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, путем повышения клеточного распознавания и абсорбции. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять примерно 5-50 аминокислот в длину, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Туг, Тгр 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). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:9). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:10), 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:11) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:12) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными после-

довательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством, представляющим собой dsRNA, посредством введенной мономерной единицы с целью нацеливания на клетку, является содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Фрагмент, представляющий собой пептид, может характеризоваться длиной в пределах от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, такой как для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно применять любую из структурных модификаций, описанных ниже.

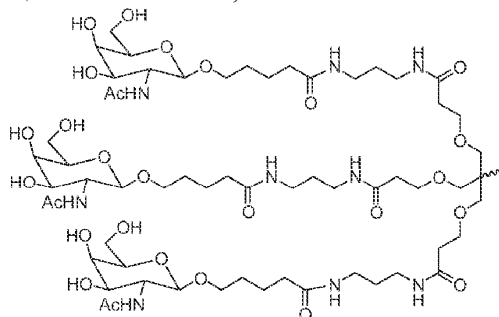
RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован для облегчения нацеливания на определенную ткань (ткани). Пептиды, содержащие RGD, и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацелены на PECAM-1 или VEGF.

"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).

С. Конъюгаты углевода.

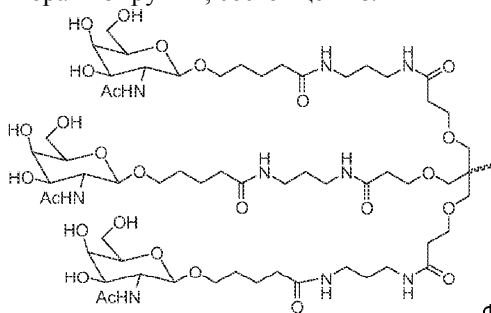
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению предлагается олигонуклеотид иРНК, дополнительно содержащий углевод. Конъюгированная с углеводом иРНК является предпочтительной для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также в композициях, пригодных для терапевтического применения *in vivo*, как описано в данном документе. Применяемый в данном документе "углевод" относится к соединению, которое является либо углеводом *per se*, состоящим из одной или нескольких единиц моносахарида, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с кислородом, азотом или атомом серы, присоединенных к каждому атому углерода; или соединению, имеющему углеводную часть в качестве его части, состоящей из одной или нескольких единиц моносахарида, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с кислородом, азотом или атомом серы, присоединенных к каждому атому углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 единиц моносахарида) и полисахариды, такие как крахмалы, целлюлоза, гликоген и полисахаридные смолы. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды, включают сахара, состоящие из двух или трех единиц моносахаридов (например, C5, C6, C7 или C8).

В одном варианте осуществления конъюгат углевода для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как

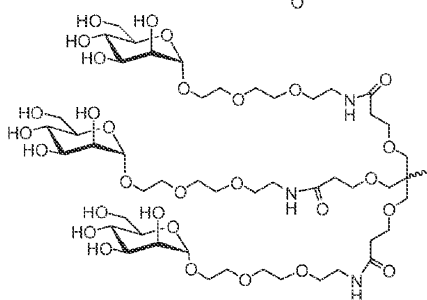


Формулы II

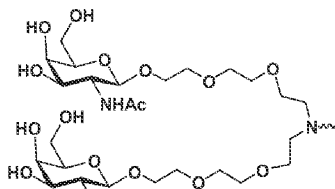
В другом варианте осуществления конъюгат углевода для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



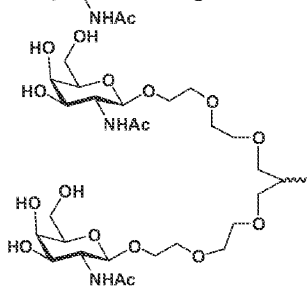
Формулы II,



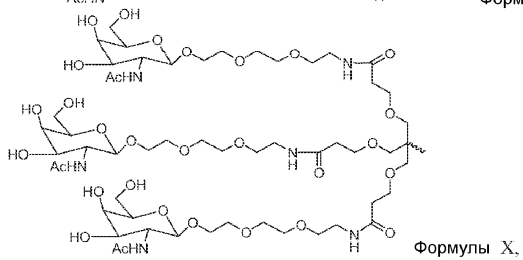
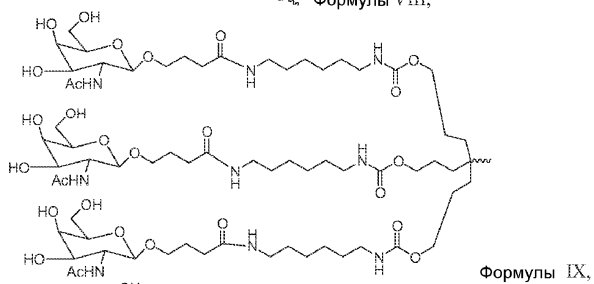
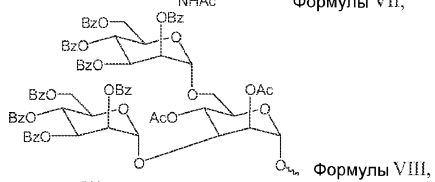
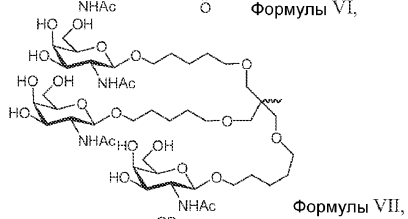
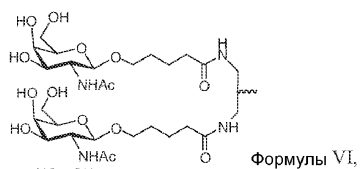
Формулы III,

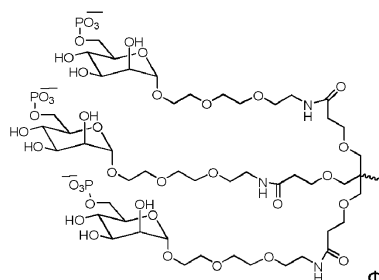


Формулы VI,

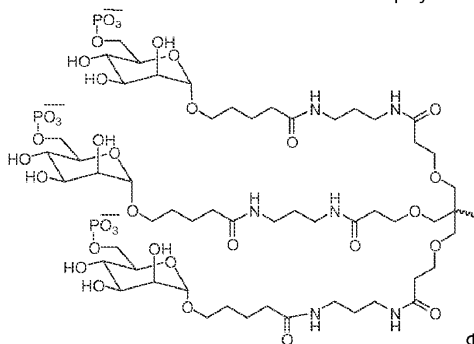


Формулы V,

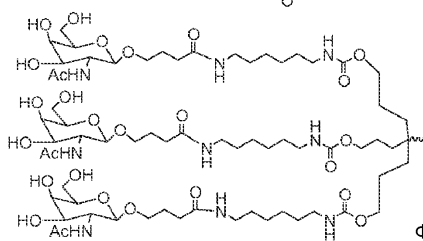




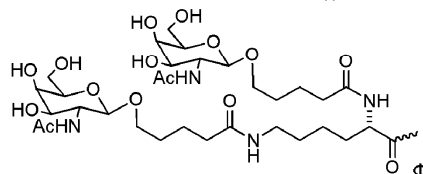
Формулы XI,



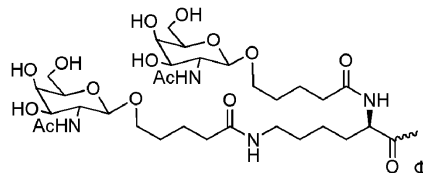
Формулы XII,



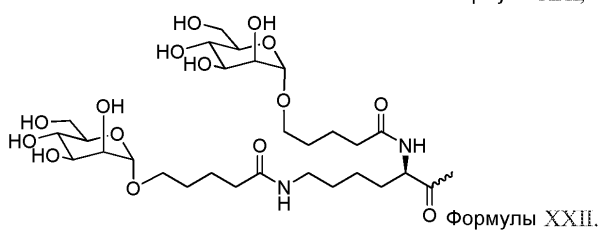
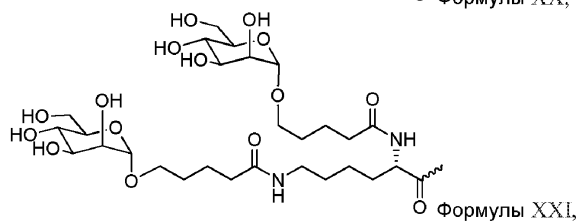
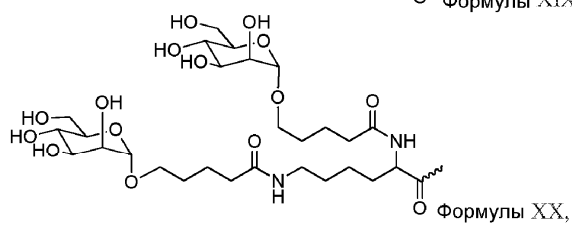
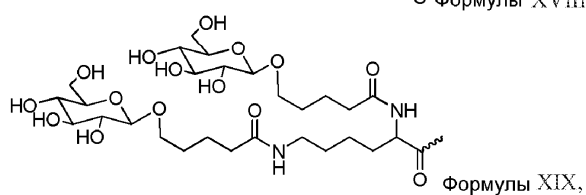
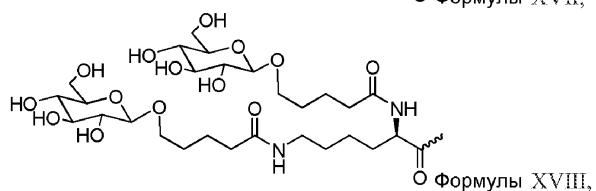
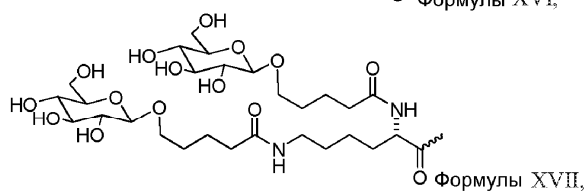
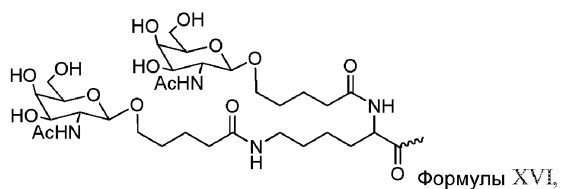
Формулы XIII,



Формулы XIV,



Формулы XV,



ния; эстеразы; эндосомы или средства, способные создать кислую среду, например, те, которые приводят к рН пять или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушить кислотно-расщепляемую связывающую группу, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая связывающая группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчива к рН. РН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как среднее внутриклеточное рН составляет немного ниже, в пределах приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислой средой с рН в пределах 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислой средой с рН в пределах 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного рН, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутрь клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может содержать расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы, введенной в линкер, может зависеть от клетки-мишени. Например, лиганд, нацеленный на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который содержит эфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами и, следовательно, линкер будет расщеплен более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты на эстеразу. Другие типы клеток, богатые на эстеразы, включают клетки легкого, коры почек и яйца.

Линкеры, содержащие пептидные связи, могут быть применены для нацеливания на типы клеток, богатых на пептидазы, например, клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность расщепляемой связывающей группы кандидата можно оценить путем оценки способности разрушающего средства (или условия) расщеплять связывающую группу кандидата. Также будет желательно также исследовать расщепляемую связывающую группу кандидата на способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другими тканями, не являющимися целевыми. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторым условием, где первое выбрано как показатель расщепления в целевой клетке, а второе выбрано как показатель расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценки могут быть выполнены в свободных клеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в органе или ткани культуры, или на животных в совокупности. Может быть полезно произвести первоначальные оценки в свободно-клеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на животных в совокупности. В предпочтительных вариантах осуществления полезные соединения кандидатов расщепляются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внеклеточных условий).

i. Окислительно-восстановительные расщепляемые связывающие группы.

В одном варианте осуществления расщепляемая связывающая группа представляет собой окислительно-восстановительную расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером восстановительной расщепляемой связывающей группы является дисульфид-связывающая группа (-S-S-). Для определения пригодности расщепляемой связывающей группы кандидата быть "восстановительной расщепляемой связывающей группой" или, например, быть пригодной для применения в конкретном фрагменте иРНК и конкретном нацеливаемом средстве, можно использовать способы, описанные в данном документе. Например, кандидата можно оценивать путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другими восстановителями с применением реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которое можно наблюдать в клетке, например, целевой клетке. Также кандидата можно оценивать в условиях, выбранных для имитирования условий в крови или сыворотке. В одном варианте осуществления соединения кандидатов расщепляются не более чем на приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления полезные соединения кандидатов разрушаются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений кандидатов может быть определена с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются -O-P(O)(OR^k)-O-, -O-P(S)(OR^k)-O-, -O-P(S)(SR^k)-O-, -S-P(O)(OR^k)-O-, -O-P(O)(OR^k)-S-, -S-P(O)(OR^k)-S-, -O-P(S)(OR^k)-S-, -S-P(S)(OR^k)-O-, -O-P(O)(R^k)-O-, -O-P(S)(R^k)-O-, -S-P(O)(R^k)-O-, -S-P(S)(R^k)-O-, -S-P(O)(R^k)-S-, -O-P(S)(R^k)-S-. Предпочтительные варианты осуществления представляют собой -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-

-S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

iii. Кислотно-расщепляемые связывающие группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит кислотно-расщепляемую связывающую группу. Кислотно-расщепляемая связывающая группа представляет собой связывающую группу, которая расщепляется в присутствии кислоты. В предпочтительных вариантах осуществления кислотно-расщепляемые связывающие группы расщепляются в кислотных условиях при pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. Специфические органеллы в клетке, содержимое которых имеет низкое значение pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить условия для расщепления кислотно-расщепляемых связывающих групп. Примеры кислотно-расщепляемых связывающих групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотно-расщепляемые группы могут характеризоваться общей формулой C=NN-, C(O)O или -OC(O). В предпочтительном варианте осуществления, когда углерод присоединен к кислороду сложного эфира (алкоксигруппе), в этом участвует арильная группа, замещенная алкильная группа или третичный алкил, такой как диметил-пентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

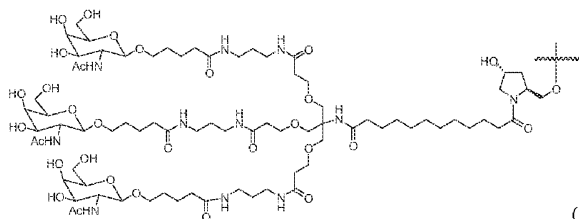
iv. Связывающие группы на основе сложного эфира.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложного эфира включают без ограничения сложные эфиры алкилена, алкенилена и алкиниленовых групп. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира представлены общей формулой -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

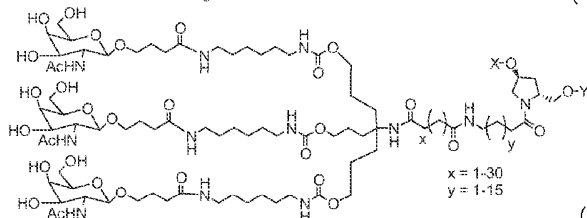
v. Расщепляемые группы на основе пептида.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая связывающая группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает амидную функциональную группу целиком. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представлены общей формулой -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

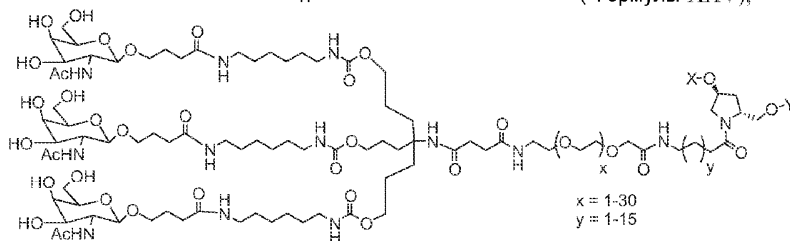
В одном варианте осуществления иРНК по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами из композиций и способов по настоящему изобретению, включают без ограничения



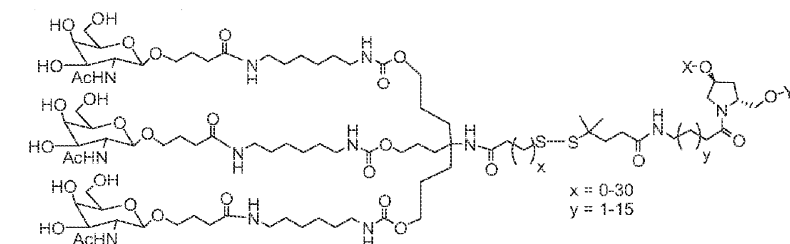
(Формулы XXIV),



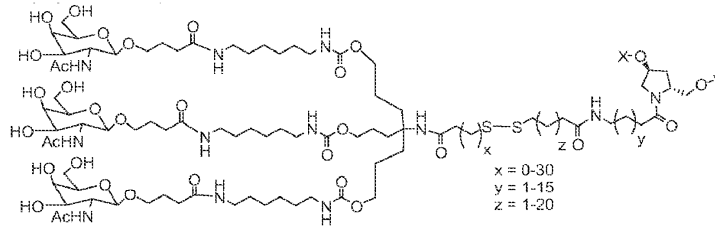
(Формулы XXV),



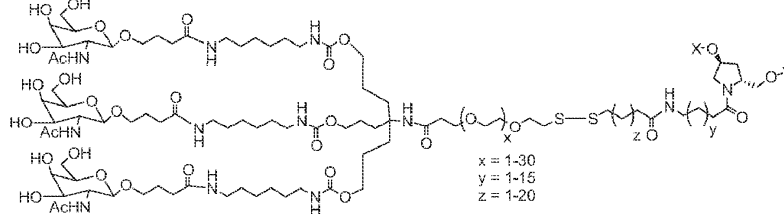
(Формулы XXVI) ,



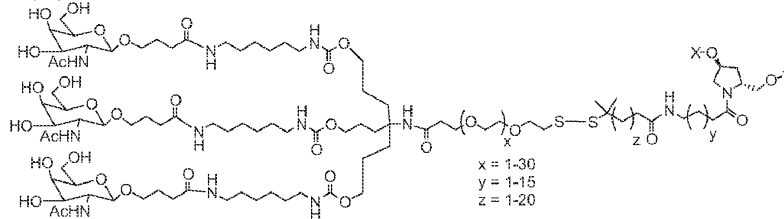
(Формулы XXVII),



(Формулы XXVIII),



(Формулы XXIX), и



(формулы XXX),

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

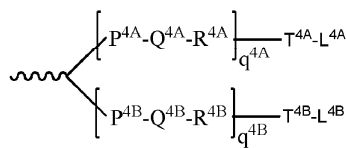
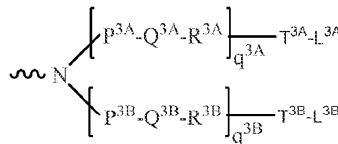
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой один или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенные через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, продемонстрированных в любой из формул (XXXI)-(XXXIV):

Формулы XXXI



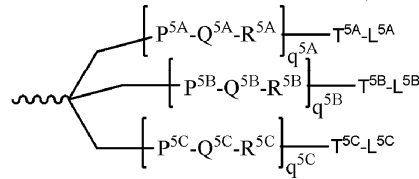
Формулы XXXII



Формулы XXXIII

, или

Формулы XXXIV

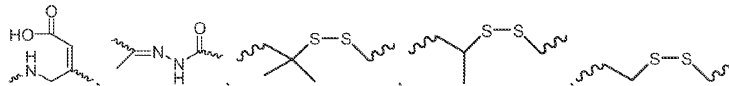


где q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо представляют собой для каждого случая 0-20 и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

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;

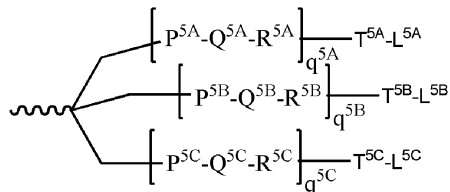
Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), 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 NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



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 (например, GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc особенно полезны для применения со средствами RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как представлены формулой (XXXV):

Формула XXXV



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных групп линкера, конъюгированных с производными GalNAc, включают без ограничения структуры, указанные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение конъюгатов РНК, включают без ограничения патенты США №№ 4828979, 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 и 5688941, 6294664, 6320017, 6576752, 6783931, 6900297, 7037646, 8106022, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Не является необходимым для всех позиций в данном соединении быть равномерно модифицированными, и на самом деле более чем одна из вышеуказанных модификаций может быть включена в отдельное соединение или даже в отдельный нуклеозид в пределах иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

Соединения "химерной" иРНК или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения иРНК, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически различных участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одного мономера, т.е. нуклеотида в случае соединения dsRNA. Такие иРНК обычно содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы наделить иРНК повышенной устойчивостью к разрушению нуклеазой, увеличенным клеточным поглощением и/или увеличением аффинности связывания в отношении целевой нуклеиновой кислоты. Дополнительно участок иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять РНК:ДНК или РНК:РНК гибриды. В качестве примера, РНКазы H является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет РНК-цепь в РНК:ДНК-дуэлексе. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования иРНК при экспрессии гена. Следовательно, сравнимые результаты зачастую можно получить с более короткими иРНК при применении химерных dsRNA по сравнению с фосфотиоатными дезокси гибридами dsRNA того же целевого участка. Расщепление РНК-мишени обычно можно обнаружить с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, методами гибридизации связанных нуклеиновых кислот, известных в данной области техники.

В некоторых случаях РНК из числа иРНК может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, были конъюгированы с иРНК в целях повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, способы выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включали липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или три-этил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969) или адамантан-уксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahe-

dron Lett., 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237), или октадециламин или фрагмент гексиламино-карбонилкоксистерина (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Иллюстративные патенты США, которые описывают получение таких конъюгатов РНК, были перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих amino-линкер в одном или нескольких положениях последовательности. Аминогруппа затем реагирует с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего сочетания или активирующих реагентов. Реакцию конъюгирования можно выполнять как с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, или после расщепления РНК в фазе раствора.

Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, приводит к получению чистого конъюгата.

IV. Доставка иРНК по изобретению.

Доставку иРНК по настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с иРНК по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения композиции, содержащей иРНК, например, dsRNA, субъекту. В альтернативном случае, доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. 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 иРНК по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian R.L. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 и WO 94/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Что касается доставки *in vivo*, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставленной молекулы, предупреждение неспецифического действия и накопление доставленной молекулы в целевой ткани. Неспецифическое действие иРНК может быть сведено 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 иРНК. Несколько исследований показали эффективный нокдаун генных продуктов при введении иРНК локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF путем как инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, M.J., et al. (2004) Retina 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, S.J., et al. (2003) Mol. Vis. 9:210-216) предупреждает образование новых сосудов в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille, J., et al. (2005) Mol. Ther. 11:267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолью (Kim, W.J., 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, P.H., et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, G.T., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, E.R., 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, K.A., et al. (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al. (2005) Nat. Med. 11:50-55). Что касается введения иРНК системно при лечении 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 с иРНК на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательного нецелевого действия. Молекулы иРНК могут быть модифицировать при помощи химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, иРНК, направленную против АроВ и конъюгированную с фрагментом, представляющим собой липофильный холестерин, вводили системно мышам и получали в результате нокдаун мРНК ароВ как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al. (2004) Nature 432:173-178). Как было показано, конъюгация иРНК с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышиных моделях рака предстательной железы (McNamara, J.O., et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления иРНК 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 иРНК (отрицательно заряженной) и также увеличивают взаимодействие на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть связанными либо с иРНК, либо на них воздействуют для образования пузырька или мицеллы (см., например, Kim S.H., et al. (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116), которые заключают в себя иРНК. Образование

пузырьков или мицелл также предупреждает разрушение иРНК при введении системно. Способы получения и введения катионных комплексов с иРНК находятся в пределах квалификации специалистов в данной области техники (см., например, Sorensen, D.R., et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, U.N., et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, A.S. 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 иРНК, включают DOTAP (Sorensen, D.R., et al. (2003), выше; Verma, U.N., et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, T.S., et al. (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, P.Y., et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al. (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet M.E., et al. (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, D.A., et al. (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al. (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления иРНК образуют комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ при помощи ссылки в полном объеме.

А. Кодированные вектором иРНК по изобретению.

иРНК, нацеленные на ген C5, могут экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A., et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную PCT публикацию № WO 00/22113, Conrad, международную PCT публикацию № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (приблизительно от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых тканей 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 цепи или цепи иРНК могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования) для экспрессирования двух отдельных цепей с получением, например, dsRNA. В альтернативном случае, каждая отдельная цепь dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линейной полинуклеотидной последовательностью, таким образом, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии с иРНК, 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 иРНК, как описано в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из ряда коммерческих источников. Обычно предусмотрены векторы, содержащие удобные сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих иРНК, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из 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 иРНК 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 типов иРНК-опосредованного нокдауна, нацеленного на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки хозяина можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить при помощи репортера, такого как флуоресцентный маркер, к примеру, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена при помощи маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гигромицину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают, без ограничения, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипокс, например, канарипокс или оспы кур; и (j) жел-

пер-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. Для обеспечения экспрессии иРНК в целевых клетках в конструкциях для рекомбинантной экспрессии иРНК, как правило, требуется наличие регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и т.д. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, описаны далее ниже.

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

Экспрессия иРНК 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-тиогалактопиранозиды (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена иРНК.

Могут быть использованы вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК. Например, возможно применение ретровирусного вектора (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 иРНК, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. 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). Lentивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для применения в доставке иРНК по настоящему изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов к респираторному эпителию. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для основанных на аденовирусах системах доставки являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышца. 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. Bout и соавт., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) показали 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); публикации PCT WO 94/12649 и Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Подходящий AV вектор для экспрессии иРНК, 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 иРНК по настоящему изобретению (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном варианте осуществления иРНК может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одноцепочечных молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AV вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помощи ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки иРНК по настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины,

как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипокс, как, например, оспа кур или канарипокс.

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

Фармацевтический препарат 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, ретровирусными векторами, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые вырабатывают систему доставки генов.

V. Фармацевтические композиции по изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фраза "фармацевтически приемлемый" применяется в данном документе для обозначения соединений, веществ, композиций и/или лекарственных форм, которые в пределах погрешности медицинской оценки, пригодных для применения при взаимодействии с тканями субъекта-человека и субъекта-животного без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерных с разумным соотношением польза/риск.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", применяемая в данном документе, означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, инертный наполнитель, вспомогательные вещества (например, смазывающее вещество, тальк, магний, стеарат кальция или цинка, или стеариновая кислота) или растворяющее инкапсулирующее вещество, участвующие в переносе и транспортировке в указанного соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не быть вредным для субъекта, подвергаемого лечению. Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солов; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и воски для суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) рН-буферные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) наполнители, такие как полипептиды и аминокислоты (23) компонента сыворотки, такие как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, пригодны для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью гена C5, например, заболевания, связанного с компонентом комплемента C5. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC) или 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 по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена C5. Как правило, приемлемая доза иРНК по настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на разовую дозу.

Например, 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,

0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Многодозный режим может включать введение терапевтического количества иРНК ежедневно, например, в течение двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней или дольше.

В других вариантах осуществления субъекту вводят, например, подкожно или внутривенно, повторную дозу терапевтического количества иРНК, например, в дозе приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Режим повторной дозы может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, каждый второй день, каждый третий день, каждый четвертый день, два раза в неделю, один раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц.

Фармацевтическая композиция может быть введена путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21, 22, 23, 24 или примерно 25-минутного периода. Введение могут повторять, например, регулярно, как, например, раз в неделю, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После первичной схемы лечения, обработку можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или иРНК 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 иРНК, 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 иРНК 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, таких, которые возможно применять со средствами по настоящему изобретению. В таком варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее кратное число суточной дозы.

В других вариантах 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. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления по настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят каждые два месяца.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе, без ограничения, тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один период лечения или серию периодов лечения. Оценки эффективных доз и времени полужизни *in vivo* для отдельных иРНК, охваченных настоящим изобретением, можно получать, используя традиционные методологии, или на основании проведения исследований *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в другой части данного документа.

Достижения в области генетики мышей обеспечили ряд мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, как, например, нарушения, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем снижения экспрессии C5. Такие модели можно использовать для проведения *in vivo* исследований иРНК, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в данной области и включают, например, мышиную модель коллаген-индуцированного артрита (Courtenay, J.S., et al. (1980) *Nature* 283, 666-668), ишемии миокарда (Homeister JW и Lucchesi BR (1994) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:17-40), мышиную модель астмы, индуцированной яичным белком (на-

пример, Tomkinson A., et al. (2001). *J. Immunol.* 166, 5792-5800), (NZB×NZW)F1, MRL/Fas^{lpr} (MRL/lpr) и мышиную модель BXSB (Theofilopoulos, A.N. и Kono, D.H. 1999. *Murine lupus models: gene-specific and genome-wide studies.* In Lahita R.G., ed., *Systemic Lupus Erythematosus*, 3rd edn, p. 145. Academic Press, San Diego, CA), мышиную модель aHUS (Goicoechea de Jorge et al. (2011) Развитие атипичного гемолитического уремического синдрома зависит от комплемента C5, *J Am Soc Nephrol* 22:137-145.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или же системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (например, при помощи трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или вдвухания 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, подоболочечное или интравентрикулярное введение.

иРНК 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 применять покрытые презервативы, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают те, в которых иРНК, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеил фосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеил фосфатидилэтаноламин (DOTMA)). иРНК, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы, иРНК 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, линолеовую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C₁₋₂₀алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмириститат (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 иРНК, содержащие мембранные молекулярные ансамбли.

иРНК для применения в композициях и способом по настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранный молекулярный ансамбль, например, липосому или мицеллу.

Применяемое 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 с иРНК. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию с иРНК, 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 бислои липосомы сливаются с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает иРНК, доставляется в клетку, где иРНК может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления иРНК в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство RNAi, могут быть получены рядом способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для образования 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 RNAi затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со средством для RNAi и конденсируются вокруг средства 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). Также можно корректировать pH для содействия 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 размера для использования в качестве средств доставки включают разрушение ультразвуком и замораживание-оттаивание с экстразией (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. Липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в клеточную цитоплазму, вследствие кислого pH внутри эндосомы (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно-заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Липосомы с pH-чувствительностью использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, к монослоям клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в целевых клетках (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Один главный тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от полученного естественным образом фосфатидилхолина. Композиции нейтральных липосом, например, могут быть образованы из 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 фосфолипидов, 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 применяется 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 ретикулоэндотели-

альной 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. Parahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозида G_{M1} , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen и соавт., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сложные эфиры сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb и соавт.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al).

В одном варианте осуществления применяют катионные липосомы. Катионные липосомы обладают преимуществом в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, не смотря на то, что они 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-нуклеиновой кислоты, 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. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис-(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

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

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991). Как сообщалось, липополизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным при трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, известны проявлением более низкой токсичности и обеспечением более эффективной трансфекции, 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 воз-

возможность вводить средство RNAi в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используют для доставки средства RNAi к эпидермальным клеткам и также для усиления проникновения средства 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. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R.M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C.Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в слой дермы кожи мышей. Такие составы со средством для RNAi пригодны для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают иРНК, 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 проникнуть через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего внутрикожного градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и зачастую могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, пригодные в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках США с серийными №№ 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 PCT заявке № PCT/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

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

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

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

ненными 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, ацил-лактаты, 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 алкиламидами, 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).

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

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C₈-C₂₂-алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять во время или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться, по сути, при любом виде смешивания ингредиентов, кроме интенсивного перемешивания для получения мицелл с меньшим размером.

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

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

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который находится под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся одной, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствует две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением части содержимого, например, посредством дозирующего клапана. Распыляемая доза фармацевтического средства выталкивается из дозирующего клапана в виде мелкодисперсной струи.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметилловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах 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.

иРНК, например, dsRNA по настоящему изобретению, может быть полностью инкапсулирована в липидном составе, например, LNP или другой частице нуклеиновой кислоты-липид.

Применяемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липид. LNP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который приведен в РСТ публикации № WO 00/03683. Частицы по настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 150 нм, чаще от примерно 60 нм до примерно 130 нм, чаще от примерно 70 нм до примерно 110 нм, наиболее часто от примерно 70 нм до примерно 90 нм и по сути являются нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновой кислоты-липид по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновой кислоты-липид и способ их получения раскрыт, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и РСТ публикации № WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение масса/масса) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находиться в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 50:1, от примерно 1:1 до примерно 25:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 10:1, от примерно 5:1 до примерно 9:1 или от примерно 6:1 до примерно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (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-диметиламиноэтил-[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)этилазанидиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте 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.

В одном варианте осуществления частицы липид-siRNA включают 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана; 10% DSPC; 40% холестерина; 10% PEG-C-DOMG (мольный процент) с размером частиц $63,0 \pm 20$ нм и соотношением siRNA/липид 0,027.

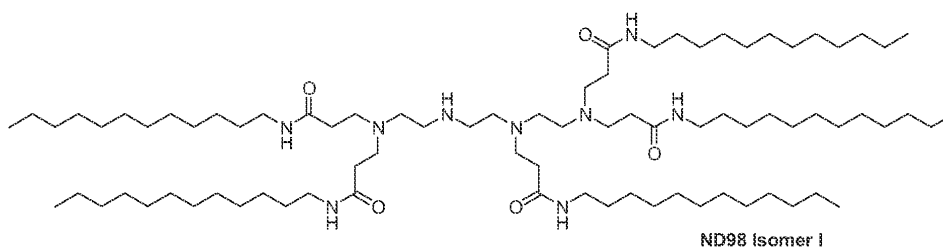
Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеил-фосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфоэтанолламин (DMPE), дистеароил-фосфатидил-этанолламин (DSPE), 16-O-монометил-PE, 16-O-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеил-фосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от примерно 5 мол.% до примерно 90 мол.%, примерно 10 мол.% или примерно 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 (C₁₂), PEG-димиристоилоксипропил (C₁₄), PEG-дипальмитилоксипропил (C₁₆) или PEG-дистеарилоксипропил (C₁₈). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% до примерно 20 мол.% или примерно 2 мол.% общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид дополнительно включают холестерин в количестве, например, от примерно 10 мол.% до примерно 60 мол.% или примерно 48 мол.% общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте 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 примерно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла примерно 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 физиологическим раствором (PBS) с pH примерно 7, например, pH примерно 6,9, pH примерно 7,0, pH примерно 7,1, pH примерно 7,2, pH примерно 7,3 или pH примерно 7,4.



Формула I

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. 1.

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
SNALP-1	1,2-дидиоленилокси-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-дидиолеил-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-дилинолеил-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-дилинолеил-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-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 60/7,5/31/1,5, липид:sirNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 60/7,5/31/1,5, липид:sirNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-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/P EG-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 (МС3)	МС- 3/DSPC/Холестерин/PEG- DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA 10:1

LNP12	1,1'-(2-(4-(2-(2-(бис(2-гидроксидодecil)амино)этил)(2-гидроксидодecil)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанаедиил)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-дидиристеоилглицерин (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 SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

XTC-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, 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.

MC3-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 по настоящему изобретению, можно получить при помощи известных методик органического синтеза, включая способы, описанные более подробно в примерах. Все заместители являются таковыми, как определено ниже, если не указано иное.

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

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

"Алкинил" означает любой алкил или алкенил, которые определены выше, которые дополнительно содержат по меньшей мере одну тройную связь между соседними атомами углерода. Типичные алкинилы с прямой цепью и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропиленил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

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

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является либо насыщенным, ненасыщенным, либо ароматическим и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизован, 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.

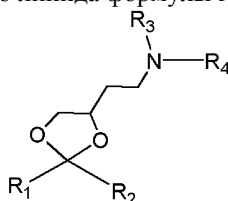
Выражения "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксо-заместителя ($=O$) замещаются два атома водорода. В связи с этим, заместители включают оксо, галоген, гетероцикл, $-CN$, $-OR^x$, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$ 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, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$ и $-SO_nNR^xR^y$.

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

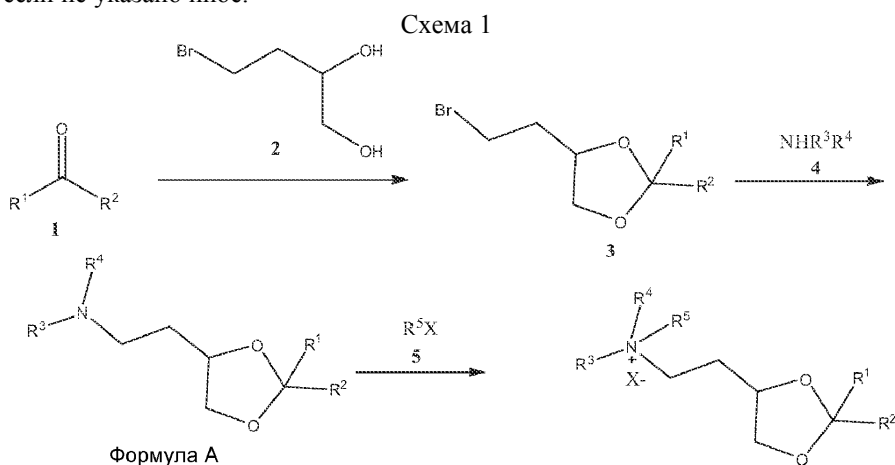
В некоторых вариантах осуществления в способах по настоящему изобретению может потребоваться использование защитных групп. Методика с использованием защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, 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. В некоторых вариантах осуществления применяют "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.

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид по настоящему изобретению составляют при помощи катионного липида формулы А:



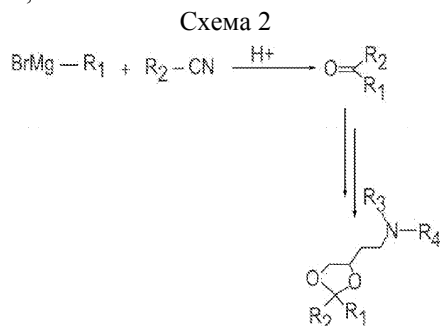
где R^1 и R^2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R^3 и R^4 независимо представляют собой низший алкил или R^3 и R^4 , могут быть совмещены для образовывания необязательно замещенного гетероциклического кольца. В некоторых вариантах 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.



Полученный по схеме 1 липид А, где R^1 и R^2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R^3 и R^4 независимо представляют собой низший алкил или R^3 и R^4 могут быть совмещены для образовывания необязательно замещенного гетероциклического кольца. 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 с 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, противоположен, 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.



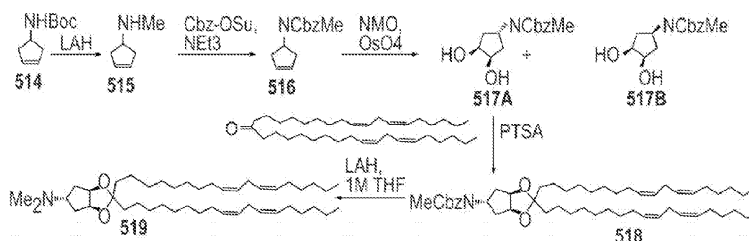
Синтез МС3.

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)карбодимида 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.

Схема 3



Синтез 515.

К перемешиваемой суспензии LiAlH_4 (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного THF в двугорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл THF при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до 0°C и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора 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 мин при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г. ^1H -ЯМР (DMCO, 400 МГц): $\delta=9,34$ (широкий, 2H), 5,68 (с, 2H), 3,74 (м, 1H), 2,66-2,60 (м, 2H), 2,50-2,45 (м, 5H).

Синтез 516.

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двухгорлой RBF добавляли NEt_3 (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонил)-сукцинимид (20 г, 0,08007 моль) 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 1н. HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором NaHCO_3 (1×50 мл). Органический слой затем высушивали над безводн. Na_2SO_4 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 (CDCl_3 , 400 МГц): $\delta=7,36-7,27$ (м, 5H), 5,69 (с, 2H), 5,12 (с, 2H), 4,96 (уш., 1H), 2,74 (с, 3H), 2,60 (м, 2H), 2,30-2,25 (м, 2H). LC-MS [M+H] - 232,3 (96,94%).

Синтез 517A и 517B.

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одногорлой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метил-морфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO_4 (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч) смесь гасили при помощи добавления твердого Na_2SO_3 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 NaHCO_3 (1×50 мл), вода (1×30 мл) и в конце соляной раствор (1×50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na_2SO_4 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 (DMCO, 400 МГц): $\delta=7,39-7,31$ (м, 5H), 5,04 (с, 2H), 4,78-4,73 (м, 1H), 4,48-4,47 (д, 2H), 3,94-3,93 (м, 2H), 2,71 (с, 3H), 1,72-1,67 (м, 4H). LC-MS - [M+H] - 266,3, [M+NH $_4^+$] - 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 (CDCl_3 , 400 МГц): $\delta=7,35-7,33$ (м, 4H), 7,30-7,27 (м, 1H), 5,37-5,27 (м, 8H), 5,12 (с, 2H), 4,75 (м, 1H), 4,58-4,57 (м, 2H), 2,78-2,74 (м, 7H), 2,06-2,00 (м, 8H), 1,96-1,91 (м, 2H), 1,62 (м, 4H), 1,48 (м, 2H), 1,37-1,25 (уш.м, 36H), 0,87 (м, 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 опять охлаждали на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизовали 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; Electrospray 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 экстракции, характеризуются 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 должны быть примерно 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 SNALP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от примерно по меньшей мере 50 нм до примерно по меньшей мере 110 нм, от примерно по меньшей мере 60 нм до примерно по меньшей мере 100 нм или от примерно по меньшей мере 80 нм до примерно по меньшей мере 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или минитаблетки. Необходимыми могут быть загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах 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 урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат 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). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе распыляемых высушенных частиц, или образуют комплексы с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-

молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), подоболо-чечного, 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 по 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 по 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 по 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 по 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.

i. Эмульсии.

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой, в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты 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, составляют 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 либо ее отсутствием. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспер-

гирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае подобных эмульсии мазевых основ и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть классифицированы 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, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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 были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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 вещества называют гидролипидным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать 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, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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, при этом сохраняя свою полутвердую консистенцию. Мелкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, неразбухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерил тристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий и улучшают 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, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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 биоуступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции иРНК 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, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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 and 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. 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, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 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 имеют 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, Captul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднепечочные (C₈-C₁₂) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C₈-C₁₀-глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как o/w, так и w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, за-

щиты 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, улучшенной клинической действенности и пониженной токсичности (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающего воздуха. Это может быть в особенности полезным, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или иРНК. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как при косметических, так и при фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное клеточное поглощение иРНК и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии по 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 иРНК и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут классифицироваться, как принадлежащие 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 был рассмотрен выше.

iii. Микрочастицы.

Средство RNAi по 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.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности иРНК, 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 происходит проникновения, 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 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 повышается абсорбция иРНК через слизистую. Вдобавок к солям желчных кислот и жирным кислотам, 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 перфорированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолеовую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀ алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и t-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 in: 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, гликоди-гидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (ПОЕ) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: 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 иРНК 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, динатриевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонных (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).

Применяемые 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 иРНК 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 иРНК на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка РСТ WO 97/30731), так же, 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), DMR1E-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Freestyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, USA), реагент для трансфекции PerFectin (Genlan-

tis; 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 BaculoPORTER (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 по настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Применяемые 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 фосфотиоатной dsRNA печеночной ткани 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 т.д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, желатинизированный 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 смазывающие 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 по 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 по 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 дополнитель-

ные 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 по 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 по настоящему изобретению. Составы могут быть стерильными и, при необходимости, их можно смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или душистыми веществами и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой (нуклеиновыми) кислотой (кислотами) состава.

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

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (а) одно или несколько соединений, представляющих собой иРНК, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые пригодны в лечении гемолитического нарушения. 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 иРНК, 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 выражать как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

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

В дополнении к их введению, рассматриваемому выше, иРНК, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией C5. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения иРНК, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

VI. Способы ингибирования экспрессии C5.

Настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии C5 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством RNAi, например, двухцепочечным средством RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии C5 в клетке, ингибируя, таким образом, экспрессию C5 в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухцепочечным средством RNAi можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт со средством RNAi *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток субъекта, например, субъекта-человека, в контакт со средством RNAi. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Приведение в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как рассматривалось выше. Более того, приведение в контакт клетки можно

выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд, представляющий собой GalNAc₃, или любой другой лиганд, который направляет средство RNAi к месту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

Выражение "ингибирование", применяемое 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 C5" означает ингибирование экспрессии любого гена C5 (такого как, например, ген C5 мыши, ген C5 крысы, ген C5 обезьяны или ген C5 человека), а также вариантов или мутантов гена C5. Таким образом, ген C5 может быть геном C5 дикого типа, мутантным геном C5 или трансгенным геном C5 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена C5" включает любой уровень ингибирования гена C5, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена C5. Экспрессия гена C5 может быть оценена на основании уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена C5, например, уровня мРНК C5, уровня белка C5 или, например, CH₅₀ активности, как меры общей гемолитической активности комплемента, AH₅₀ для измерения гемолитической активности альтернативного пути комплемента и/или уровня лактатдегидрогеназы (LDH), как меры внутрисосудистого гемолиза и/или уровня гемоглобина. Уровни C5a-, C5b- и растворимого C5b-9-комплекса также можно измерять для оценки экспрессии C5. 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 C5, 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 по настоящему изобретению экспрессия гена C5 ингибируется по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена C5 может служить снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген C5 и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством RNAi по настоящему изобретению или посредством введения средства RNAi по настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена C5 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)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

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

В альтернативном случае, ингибирование экспрессии гена C5 можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена C5, например, экспрессией белка C5, экспрессией гена или белка гепсидина, или уровнем железа в тканях или сыворотке. Сайленсинг гена C5 можно выявить в любой клетке, экспрессирующей C5, либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области. Печень является основным местом экспрессии C5. Другие важные места экспрессии включают почки и матку.

Доказательством ингибирования экспрессии белка C5 может служить снижение уровня белка C5, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в об-

разце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии мРНК, 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 применять для оценки ингибирования экспрессии гена C5, включают клетку или группу клеток, которые еще не были в контакте со средством RNAi по 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 RNAi.

Уровень мРНК C5, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять при помощи любого способа, известного в данной области, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии C5 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена C5. РНК можно извлекать из клеток при помощи метода 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.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии C5 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", применяемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим C5. 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 мРНК 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 мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК C5. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем пропускания выделенной мРНК через агарозный гель и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, на генном микрочипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровней мРНК C5.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии C5 в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК), например, мРНК 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 "катящегося 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 по настоящему изобретению уровни экспрессии C5 определяют при помощи флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™ System).

Уровни экспрессии мРНК C5 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 C5 также может включать применение зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с применением 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 C5 можно определить, применяя 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, абсорбцион-

ную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Выражение "образец", применяемое 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. В определенных вариантах осуществления образцы можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму, полученные от субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени, полученную от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство RNAi вводят субъекту так, что средство RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии C5 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня мРНК C5 или белка C5 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.

Фраза "приведение клетки в контакт со средством RNAi", таким как dsRNA, применяемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт со средством RNAi включает приведение клетки в контакт с иРНК *in vitro* или приведение клетки в контакт с иРНК *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство RNAi можно приводить в физический контакт с клеткой путем отдельного осуществления способа или, в качестве альтернативы, средство 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 RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем введения инъекцией средства RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем введения инъекцией средства RNAi в другую область, например, кровоток или подкожное пространство так, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт со средством. Например, средство RNAi может содержать лиганд и/или может быть связано с ним, например, GalNAc₃, который направляет средство RNAi к месту, представляющему интерес, например, к печени. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Например, клетку также можно приводить в контакт со средством RNAi *in vitro* и в дальнейшем пересаживать субъекту.

В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с иРНК включает "введение" или "доставку иРНК в клетку", облегчая или осуществляя поглощение или абсорбцию в клетку. Абсорбция или поглощение иРНК может происходить путем произвольных диффузных или активных клеточных процессов, или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение иРНК в клетку может быть *in vitro* и/или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* иРНК может быть введена парентерально в участок ткани или введена системно. Доставку *in vivo* можно осуществить с помощью системы доставки бета-глюкан, таких как описаны в патентах США №№ 5032401 и 5607677, а также публикации № US 2005/0281781, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Введение в клетку *in vitro* включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дальнейшие подходы описаны в данном документе ниже и/или как известны в данной области техники.

VII. Способы лечения или предотвращения заболевания, связанного с компонентом комплемента C5.

Настоящее изобретение обеспечивает также терапевтические и профилактические способы, включающие введение субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS, средства, представляющего собой иРНК, фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, или вектора, содержащего иРНК, по настоящему изобретению. В некоторых аспектах настоящего изобретения способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS. Способы лечения (и при-

менения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, нацеленного на ген C5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленной на ген C5, тем самым осуществляя лечение субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS, которые включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, нацеленного на ген C5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на ген C5, и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба), тем самым осуществляя лечение субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA, или вектора по настоящему изобретению, предотвращая тем самым по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие. Например, настоящее изобретение предлагает способы предотвращения гемолиза субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA, или вектора по настоящему изобретению, и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба), предотвращая тем самым по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

"Терапевтически эффективное количество", применяемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства RNAi или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба), которого при введении субъекту, страдающему заболеванием, связанным с C5, 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 RNAi, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей субъекта, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", применяемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства RNAi или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба), которого при введении субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, но еще (или в настоящее время) не испытывавшему или не демонстрирующему симптомы заболевания, и/или который представляет собой объект риска развития заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, например, субъекту, страдающему реакцией отторжения трансплантата и/или после пересадки, например, сенсibilизированное или аллогенное отторжение, субъекту с сепсисом и/или субъекту с инфарктом миокарда, 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, представляющего собой иРНК, или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента, пути введения средства, антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента, 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 включает количество средства RNAi или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего

вающего фрагмента (например, экулизумаба), которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства, представляющие собой иРНК, применяемые в способах по настоящему изобретению можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению при лечении субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, например, антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба) при лечении субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA, по настоящему изобретению, нацеленного на ген C5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на ген C5, при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, такого как субъект, страдающий заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA, по настоящему изобретению, нацеленного на ген C5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на ген C5, при производстве лекарственного средства для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), для лечения субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, с заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению иРНК, например, dsRNA по настоящему изобретению для предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA по настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), для предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению при производстве лекарственного средства для предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), для предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на C5, вводят субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, таким образом, что уровни C5, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой ткани или жидкости субъекта снижаются на по меньшей мере приблизительно 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере приблизительно 99% или более, и затем вводят субъекту дополнительное терапевтическое средство (как описано ниже).

Дополнительное терапевтическое средство может быть антителом к компоненту комплемента C5,

или его антигенсвязывающим фрагментом, или его производным. В одном варианте осуществления антитело к компоненту комплемента C5 представляет собой экулизумаб (SOLIRIS®), или его антигенсвязывающий фрагмент, или его производное. Экулизумаб представляет собой гуманизированный моноклональный IgG2/4, легкую каппа-цепь антитела, который специфически связывается с компонентом комплемента C5 с высокой аффинностью и ингибирует расщепление C5 до C5a и C5b, тем самым ингибируя образование конечного комплекса комплемента C5b-9. Экулизумаб описан в патенте США № 6355245, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

Способы по настоящему изобретению, включающие введение субъекту средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению и экулизумаба, могут дополнительно содержать введение субъекту менингококковой вакцины.

Дополнительное терапевтическое средство, например, экулизумаб и/или менингококковую вакцину можно вводить субъекту одновременно со средством, представляющим собой иРНК, нацеленным на C5, или в разное время.

Кроме того, дополнительное терапевтическое средство, например, экулизумаб, можно вводить субъекту в одном составе со средством, представляющим собой иРНК, нацеленным на C5, или в другом составе, как средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на C5.

Схема приема экулизумаба описана, например, в инструкции на продукт экулизумаб (SOLIRIS®) и в заявке на патент США № 2012/0225056, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В иллюстративных способах по настоящему изобретению для лечения заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS, средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на C5, сперва вводят (например, подкожно) субъекту таким образом, что уровни C5 у субъекта уменьшаются (например, на по меньшей мере приблизительно 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере приблизительно 99% или более), а затем вводят экулизумаб в дозах, меньших, чем описаны в инструкции на продукт SOLIRIS®. Например, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого. Экулизумаб также можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого. Если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через одну неделю в дозе менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой приблизительно через одну неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту в раз неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого. Если объекту проводят плазмоферез или замещение плазмы, экулизумаб можно вводить субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 300 мг) или меньше, чем приблизительно 600 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 600 мг или более). Если объекту проводят инфузию плазмы, экулизумаб можно вводить субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 300 мг или более). Более низкие дозы экулизумаба можно вводить либо подкожно, или внутривенно.

При комбинированной терапии по настоящему изобретению, включающей экулизумаб, экулизумаб можно вводить субъекту, например, подкожно в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, или от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. Например, экулизумаб можно вводить субъекту, например, подкожно в дозе

0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7 мг/кг, 7,5 мг/кг, в дозе 8 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9 мг/кг, 9,5 мг/кг, 10 мг/кг, 10,5 мг/кг, 11 мг/кг, 11,5 мг/кг, 12 мг/кг, 12,5 мг/кг, 13 мг/кг, 13,5 мг/кг, 14 мг/кг, 14,5 мг/кг или 15 мг/кг.

Способы и применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, таким образом, чтобы экспрессия целевого гена C5 уменьшилась, например, на период приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена C5 уменьшается на протяжении длительного срока, например, по меньшей мере приблизительно двух, трех, четырех, пяти, шести, семи дней или более, например, приблизительно одной недели, двух недель, трех недель или приблизительно четырех недель или дольше.

Введение dsRNA согласно способам и применениям по настоящему изобретению может привести к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5. "Снижение" в данном контексте подразумевает статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может произойти, например, на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем определения прогрессирования заболевания, ремиссии, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, подходящего для данного заболевания, подвергаемого лечению или нацеленного на его предотвращение. Вполне в пределах способности специалиста в данной области техники контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения гемолитического нарушения можно оценить, например, с помощью периодического контроля уровней LDH и CH₅₀. Сравнение поздних показаний с начальными показаниями обеспечивает врача показаниями, является ли лечение эффективным. Вполне в пределах способности специалиста в данной области техники контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с этим введение иРНК, нацеленной на C5, или ее фармацевтической композиции "эффективной против" заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, показывает, что введение клинически соответствующим способом приводит к благотворному воздействию на по меньшей мере статистически значимую часть пациентов, такому как улучшению симптомов, лечению, снижению заболеваний, продлению жизни, улучшению качества жизни или другому эффекту, как правило признанному положительным врачами, знакомыми с лечением заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, и связанных причин.

Эффект лечения или предупредительное действие 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 данного лекарственного препарата iRNA или состава этого лекарственного препарата можно также судить при помощи экспериментальной животной модели для данного заболевания, которая известна в данной области. При использовании экспериментальной животной модели, эффективность лечения доказана, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

Кроме того, эффективность может быть оценена при уменьшении тяжести заболевания, что определяется специалистом в данной области диагностики, основываясь на клинически принятой шкале оценки тяжести заболевания, как один из примеров шкалы интенсивности боли при ревматоидном артрите (RASS). Любое позитивное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, оцениваемому с использованием соответствующего масштаба, представляет адекватное лечение с применением иРНК или состава, представляющего собой иРНК, как описано в данном документе.

Субъекту можно вводить терапевтическое количество иРНК, например, приблизительно 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,55 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,65 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,75 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,85 мг/кг, 0,9 мг/кг, 0,95 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг dsRNA, 2,6 мг/кг dsRNA, 2,7 мг/кг dsRNA, 2,8 мг/кг dsRNA, 2,9 мг/кг dsRNA, 3,0 мг/кг dsRNA, 3,1 мг/кг dsRNA, 3,2 мг/кг dsRNA, 3,3 мг/кг dsRNA, 3,4 мг/кг dsRNA, 3,5 мг/кг dsRNA, 3,6 мг/кг dsRNA, 3,7 мг/кг dsRNA, 3,8 мг/кг dsRNA, 3,9 мг/кг dsRNA, 4,0 мг/кг dsRNA, 4,1 мг/кг dsRNA, 4,2 мг/кг dsRNA, 4,3 мг/кг dsRNA, 4,4 мг/кг dsRNA, 4,5 мг/кг dsRNA, 4,6 мг/кг dsRNA, 4,7 мг/кг dsRNA, 4,8 мг/кг dsRNA, 4,9 мг/кг dsRNA, 5,0 мг/кг dsRNA, 5,1 мг/кг dsRNA, 5,2 мг/кг dsRNA, 5,3 мг/кг dsRNA, 5,4 мг/кг dsRNA, 5,5 мг/кг dsRNA, 5,6 мг/кг dsRNA, 5,7 мг/кг dsRNA, 5,8 мг/кг dsRNA, 5,9 мг/кг dsRNA, 6,0 мг/кг dsRNA, 6,1 мг/кг dsRNA, 6,2 мг/кг dsRNA, 6,3 мг/кг dsRNA, 6,4 мг/кг dsRNA, 6,5 мг/кг dsRNA, 6,6 мг/кг dsRNA, 6,7 мг/кг dsRNA, 6,8 мг/кг

приблизительно 7,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 40 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления, где композиция по настоящему изобретению содержит dsRNA, как описано в данном документе, и N-ацетилгалактозамин, субъекту можно вводить терапевтическое количество от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

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

иРНК может быть введена путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или примерно 25-минутного периода. Введение могут повторять, например, регулярно, как, например, раз в неделю, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После первичного режима обработки обработки можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Введение иРНК может снизить уровень С5, например, в клетке, ткани, крови, моче или других компартментах пациента на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере приблизительно 99% или более.

Перед введением полной дозы иРНК пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например,

5% инфузию и наблюдать их в отношении отрицательного действия, как, например, аллергических реакций. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательного иммуностимулирующего действия, как, например, повышения уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Благодаря ингибирующему действию на экспрессию C5, композиция по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, приготовленная из нее, может повысить качество жизни.

иРНК по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме или в виде "свободной иРНК". Голую иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Голая иРНК может быть в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора иРНК можно корректировать, с тем чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно, иРНК по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, например, в составе липосомной dsRNA.

Субъектами, у которых снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, являются те, кто страдает заболеванием или нарушением, связанным с компонентом комплемента C5, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает ночной пароксизмальной гемоглобинурией (PNH). В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает астмой. В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает ревматоидным артритом. В еще одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает системной красной волчанкой. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает гломерулонефритом. В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает псориазом. В еще одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает дерматомиозитом буллезного пемфигоида. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает атипичным гемолитико-уремическим синдромом. В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает гемолитико-уремическим синдромом, вызванным Шига-подобным токсином *E. coli*. В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает миастенией. В еще одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает оптиконевромиелитом. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает болезнью плотного осадка. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает C3-нефропатией.

В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает связанной с возрастом дегенерацией желтого пятна. В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает болезнью холодových агглютининов. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает васкулитом, связанным с антителами к цитоплазме нейтрофилов. В другом варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает реакцией отторжения трансплантата, вызванной гуморальными и сосудистыми механизмами. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает дисфункцией трансплантата. В одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает инфартом миокарда. В другом варианте осуществления заболевание, которым страдает субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, представляет собой сенсibilизированное отторжение трансплантата. В еще одном варианте осуществления субъект, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, страдает сепсисом.

Лечение субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии гена C5 окажет благоприятное воздействие, включает терапевтическое и профилактическое (например, субъект перенес операцию сенсibilизированной (или аллогенной) пересадки) лечение.

Кроме того, изобретение относится к способам и применению средства, представляющего собой иРНК, или его фармацевтической композиции (включая способы и применение средства, представляющего собой иРНК, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, и антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент) для лечения субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, у субъекта, страдающего заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими способами, например, известными фармацевтическими и/или терапевтическими способами, такие как, например, те, которые в настоящее время применяют при лечении этих нарушений. Например, в некоторых вариантах осу-

шествления иРНК, нацеленную на C5, вводят в комбинации с, например, средством, пригодным при лечении заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, как описано в других частях данного документа.

Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, пригодные для лечения субъекта, у которого снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, субъекта, страдающего заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, включают плазмоферез, тромболитическую терапию (например, с применением стрептокиназы), антиагреганты, фолиевую кислоту, кортикостероиды; иммунодепрессанты; эстрогены, метотрексат, 6-МР, азатиоприн, сульфасалазин, месалазин, олсалазин, хлорохин/гидрохлорохин, пеницилламин, ауриотиомалат (внутримышечно и перорально), азатиоприн, колхицин, кортикостероиды (пероральные, ингаляционные и местные инъекции), бета-2 агонисты адренорецепторов (сальбутамол, тербуталин, салметерол), ксантины (теофиллин, аминофиллин), кромогликат, недокромил, кетотифен, ипратропий и окситропий, циклоспорин, FK-506, рапамицин, микофенолятмофетил, лефлуномид, NSAID, например, ибупрофен, кортикостероиды, такие как преднизолон, ингибиторы фосфодиэстеразы, агонисты, аденозина, антитромботические средства, ингибиторы комплемента, аднергические средства, средства, препятствующие сигнальной функции провоспалительных цитокинов, такие как TNF- α или IL-1 (например, ингибиторы киназы IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP), ингибиторы фермента IL-1 β -преобразования, ингибиторы фермента TNF α -преобразования (TACE), ингибиторы сигнальных T-клеток, таких как ингибиторы киназы, ингибиторы металлопротеиназ, сульфасалазин, азатиоприн, 6-меркантопурины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, рецепторы растворимых цитокинов и их производные (например, растворимые p55 или p75 TNF-рецепторы и производные p75TNFR1gG (Enbrel™ и p55TNFR1gG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII и sIL-6R), противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF β), цеlexоксид, фолиевая кислота, гидроксид хлорохин сульфат, рофекоксид, этанерцепт, моноклональное антитело инфликсид, напроксен, валдекоксид, сульфасалазин, метилпреднизолон, мелоксикам, метилпреднизолон ацетат, золото, тиомалат натрия, аспирин, триамцинолона ацетонид, пропексифена напсилат/апап, фолат, набуметон, диклофенак, пироксикам, этодолак, диклофенак натрия, оксапрозин, оксикодона гидрохлорид, гидрокодона битартрат/апап, диклофенак натрия/мизопростол, фентанил, анакинра, рекомбинантный иммуноглобулин человека, трамадола гидрохлорид, салсалат, сулиндак, цианокобаламин/фа/пиридоксин, ацетаминофен, алендронат натрия, преднизолон, сульфат морфина, лидокаина гидрохлорид, индометацин, глюкозамин сульфат/хондроитин, амитриптилина гидрохлорид, сульфадиазин, оксикодона гидрохлорид/ацетаминофен, олопатадина гидрохлорид, мизопростол, напроксен натрия, омепразол, циклофосфамид, моноклональное антитело ритуксид, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, антитело к IL-18, антитело к IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, рофлумиласт, IC-485, CDC-801, мезопрам, циклоспорин, цитокин-супрессивный противовоспалительный лекарственный препарат(ы) (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (гуманизированное антитело к TNF α ; Celltech/Bayer); cA2/моноклональное антитело инфликсид (химерное антитело к TNF α ; Centocor); 75 kDa TNFR-IgG/этанерцепт (75 кДа рецептор TNF-IgG слитый белок; Immunex, см., например, (1994) *Arthr. Rheum.* 37: S295; (1996) *J. Invest. Med.* 44: 235A); 55 кД TNF-IgG (55 кД рецептор TNF-IgG слитый белок Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (не осуществляющее деплецию приматизированное антитело к CD4; IDEC/SmithKline; см., например, (1995) *Arthr. Rheum.* 38: S185); DAB 486-IL-2 и/или DAB 389-IL-2 (IL-2 слитые белки; Seragen; см., например, (1993) *Arthrit. Rheum.* 36: 1223); антитело к Tас (гуманизированное антитело к IL-2R α ; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (противовоспалительный цитокин; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; рекомбинантный IL-10, противовоспалительный цитокин; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 и/или IL-4 агонисты (например, антитела агонистов); IL-1RA (антагонист IL-1-рецептора; Synergen/Amgen); анакинра (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (растворимый TNF-связывающий белок; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S284; (1995) *Amer. J. Physiol. - Heart and Circ. Physiol.* 268: 37-42); R973401 (ингибитор фосфодиэстеразы тип IV; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S282); МК-966 (COX-2-ингибитор; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S81); илопрост (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S82); метотрексат; талидомид (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S282) и талидомид-связанные лекарственные препараты (например, Celgen); лефлуномид (противовоспалительный и ингибитор цитокина, см. например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S131; (1996) *Inflamm. Res.* 45: 103-107); транексамовая кислота (ингибитор активации плазминогена, см. например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S284); T-614 (ингибитор цитокина; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S282); простагландин E1 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S282); тенитап (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement)): S280); напроксен (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат; см., например, (1996) *Neuro. Report* 7: 1209-1213); мелоксикам (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); ибупрофен (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); пироксикам (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); диклофенак (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); индометацин (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат);

воспалительный лекарственный препарат); сульфасалазин (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement): S281); азатиоприн (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement): S281); ингибитор ICE (ингибитор интерлейкин-1 α превращающего фермента); ингибитор zap-70 и/или lck (ингибитор тирозинкиназы zap-70 или lck); ингибитор VEGF и/или ингибитор VEGF-R (ингибиторы фактора роста клеток эндотелия сосудов или рецептор фактора роста клеток эндотелия сосудов; ингибиторы ангиогенеза); кортикостероидные противовоспалительные лекарственные средства (например, SB203580); ингибиторы конвертазы TNF; антитела к IL-12; антитела к IL-18; интерлейкин-11 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement): S296); интерлейкин-13 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement): S308); ингибиторы интерлейкин-17 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39 (9 (supplement): S120); золото; пеницилламин; хлорохин; хлорамбуцил; гидроксихлорохин; циклоспорин; циклофосфамид; общее облучение лимфоидной ткани; антитело-глобулин к T-клеткам; антитела к CD4; CD5-токсины; перорально вводимые пептиды и коллаген; динатрий лобензарит; средства, регулирующие цитокины (CRA) HP228 и HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1-антисмысловые фосфотиоатные олигонуклеотиды (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор комплемента 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); преднизолон; оротеин; гликозаминогликан полисульфат; миноциклин; антитела к IL2R, липиды морского и ботанического происхождения (жирные кислоты рыбы и семян растений) см., например, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21: 759-777); ауранофин; фенилбутазон; мелкофенамовая кислота; флуфенамовая кислота; иммуноглобулин для внутривенного введения; зилеутон; азарибин; микрофенолоксид (RS-61443); такролимус (FK-506); сиролимус (рапамицин); амиприлоз (терафектин); кладрибин (2-хлордезоксиаденозин); метотрексат; ингибиторы bcl-2 (см. Bruncko, M. et al. (2007) *J. Med. Chem.* 50(4): 641-662); противовирусные и иммуномодулирующие средства, малую молекулу ингибитора KDR, малую молекулу ингибитора Tie-2; метотрексат; преднизолон; целекоксиб; фолиевую кислоту; гидроксихлорохин сульфат; рофекоксиб; этанерсепт; моноклональное антитело инфликс; лефлуномид; напроксен; валдекоксиб; сульфасалазин; метилпреднизолон; ибупрофен; мелоксикам; ацетат метилпреднизолона; золото тиомалат натрия; аспирин; азатиоприн; триамцинолона ацетонид; пропксифена напсилат/апап; фолат; набуметон; диклофенак; пироксикам; этодолак; диклофенак натрия; оксапрозин; оксикодона гидрохлорид; гидрокодона битартрат/апап; диклофенак натрия/мизопростол; фентанил; анакинра, рекомбинантный глобулин человека; трамадола гидрохлорид; салсалат; сулиндак; цианкобаламин/fa/пиридоксин; ацетаминофен; алендронат натрия; преднизолон; сульфат морфина; лидокаина гидрохлорид; индометацин; глюкозамина сульфат/хондроитин; циклоспорин; амитриптилина гидрохлорид; сульфадиазином; оксикодон гидрохлорид/ацетаминофен; олопатадина гидрохлорид; мизопростол; напроксен натрия; омепразол; микрофенолятмофетил; циклофосфамид; моноклональное антитело ритукси; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; антитело к IL 18; антитело к IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; рофлумиласт; IC-485; CDC-801; мезопрам, альбутерол, сальметерол/флутиказон, монтелукаст натрия, пропионат флутиказона, будесонид, преднизон, ксинафоат салметерола, левальбутерол гидрохлорид, альбутерола сульфат/ипратропиум, натрия фосфат преднизолон, триамцинолона ацетонид, беклометазон дипропионат, ипратропия бромид, азитромицин, пирбутерола ацетат, преднизолон, теofilлин безводный, натрия сукцинат метилпреднизолон, клэритромицин, зафирлукаст, формотерола фумарат, вакцина против вируса гриппа, метилпреднизолон, амоксициллина тригидрат, флунизолид, инъекции против аллергии, кромолин натрия, фексофенадина гидрохлорид, флунизолид/ментол, амоксициллин/клавуланат, левофлоксацин, вспомогательное устройство для ингаляций, гуафенизин, дексаметазона натрия фосфат, моксифлоксацина гидрохлорид, доксицилина гиклат, гуаифенезин/d-меторфан, р-эфедрин/кодеин/хлорфенир, гатифлоксацин, цетиризина гидрохлорид, мометазона фураат, сальметерола ксинафоат, бензонатат, цефалексин, фенилэфрин/гидрокодон/хлорфенирамин, цетиризина гидрохлорид/псевдоэфедрин, фенилэфрин/кодеин/прометазин, кодеин/прометазин, цефпрозил, дексаметазон, гуаифенезин/псевдоэфедрин, хлорфенирамин/гидрокодон, недокромил натрия, тербуталина сульфат, эпинефрин, метилпреднизолон, метапротеренола сульфат, аспирин, нитроглицерин, метопролола тартрат, эноксапарин натрия, гепарин натрия, клопидогреля бисульфат, карведилол, атенолол, морфина сульфат, метопролола сукцинат, варфарин натрия, лизиноприл, изосорбида мононитрат, дигоксин, квинаприла гидрохлорид/mag carb, буметанид, альтеплаза, эналаприлат, амиодарона гидрохлорид, тирофибана гидрохлорид м-гидрат, дилтиазема гидрохлорид, каптоприл, ирбесартан, валсартана, пропранолола гидрохлорид фуросемид, симвастатин, рамиприл, тенектеплаза, эналаприла малеат, торсемид, ретаваз, лозартан калия, фозиноприл натрия, лидокаина гидрохлорид, эптифибатид, цефазолин натрия, атропина сульфат, аминокaproновую кислоту, спиронолактон, интерферон, соталола гидрохлорид, хлорид калия, докузат натрия, добутамина гидрохлорид, алпразолам, правастатин натрий, аторвастатин кальция, мидазолама гидрохлорид, гидроморфона гидрохлорид, изосорбида динитрат, адреналин, дофамин гидрохлорид, бивалирудин, розувастатин, эзетимиб/симвастатин, авасимиб и карипорид.

Средство, представляющее собой иРНК (и/или антитело к компоненту комплемента C5) и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельного состава, или в разное время, и/или другим способом, известным в данной области техники или описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к способам применения средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, по настоящему изобретению для уменьшения и/или ингибировать экспрессии компонента комплемента C5 в клетке. В других аспектах настоящее изобретение относится к иРНК по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей иРНК по настоящему изобретению, для применения при уменьшении и/или ингибировании экспрессии компонента комплемента C5 в клетке. В других аспектах предусматривается применение иРНК по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей иРНК по настоящему изобретению при производстве лекарственного средства для уменьшения и/или ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке.

Способы и применения включают приведение клетки в контакт с иРНК, например, dsRNA по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления мРНК-транскрипта гена C5, ингибируя, таким образом, экспрессию гена C5 в клетке.

Уменьшение экспрессии гена можно оценить любым из способов, известных в данной области. Например, снижение экспрессии C5 можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК C5 с применением обычных способов, известных обычному специалисту в данной области, например, Нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка C5 с применением обычных способов, известных обычному специалисту в данной области, таких как Вестерн-блоттинг, иммунологические методы, способ проточной цитометрии, ELISA, и/или путем определения биологической активности C5, как при реакции гемолиза CH₅₀ или AH₅₀, и/или путем определения биологической активности одной или нескольких молекул, связанных с системой комплемента, например, продуктами C5, такими как C5a и C5b (или *in vivo* условиях, например, в условиях гемолиза).

В способах и вариантах применения настоящего изобретения клетка может вступать в контакт *in vitro* или *in vivo*, т.е. клетка может быть в пределах субъекта. В вариантах осуществления настоящего изобретения, когда клетка находится пределах субъекта, способы могут включать дополнительное приведение клетки в контакт с антителом к компоненту комплемента C5, например, экулизумабом.

Клеткой, пригодной для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, экспрессирующая ген C5. Клеткой, пригодной для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (например, клетка человека или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетка отличного от примата (например, клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кошки, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетка птицы (например, клетка утки или клетка гуся), или клетка кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека.

Экспрессию C5 можно ингибировать в клетке на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100%.

Способы и варианты применения *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере части РНК-транскрипта гена C5 млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающего, такого как человек, композицию можно вводить любыми способами, известными в данной области техники, включая без ограничения подкожное, внутривенное, оральное, внутривентральное или парентеральное введение, включая внутривентральное (например, внутривентральное, интрапаренхимальное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и подязычное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят в виде подкожных или внутривенных инфузий или инъекций.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции вещества замедленного всасывания. Инъекция вещества замедленного всасывания может высвобождать иРНК устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, при помощи инъекции вещества замедленного всасывания можно снижать частоту введения доз, необходимых для получения необходимого действия, например, необходимого ингибирования C5, или терапевтического или профилактического действия. Инъекция вещества замедленного всасывания может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыворотке. Инъекции вещества замедленного всасывания могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция вещества замедленного всасывания является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введения осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. В определенных вариан-

тах осуществления насос является подкожно имплантированным осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является имплантируемым хирургическим путем насосом, который доставляет иРНК в печень.

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.

В одном аспекте настоящее также изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии гена C5 у человека. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей иРНК, например, dsRNA, нацеленной на ген C5 в клетке млекопитающего для применения в ингибировании экспрессии гена C5 у млекопитающего. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению иРНК, например, dsRNA, нацеленной на ген C5 в клетке млекопитающего, при производстве лекарственного средства для ингибирования экспрессии гена C5 у млекопитающего.

Способы и варианты применения включают введение млекопитающему, например, человеку, композиции, содержащей иРНК, например, dsRNA, нацеленной на ген C5 в клетке млекопитающего и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления мРНК-транскрипта гена C5, ингибируя, таким образом, экспрессию гена C5 у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение субъекту антитела к компоненту комплемента C5, например, экулизумаба.

Уменьшение экспрессии гена можно оценить любым из способов, известных в данной области, например qRT-PCR, описанным в данном документе. Снижение синтеза белка можно оценить любым из способов, известных в данной области, например, ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления биопсия печени в виде пункции служит образцом ткани для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка C5. В другом варианте осуществления образец крови служит образцом ткани для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка C5. В других вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена C5 контролируют косвенно, например, путем определения экспрессии и/или активности гена в пути биосинтеза C5, включая, например, C5a, C5b и растворимый C5b-9 (см, например, фиг. 1). Например, активность CD59 можно мониторить для определения ингибирования экспрессии гена C5. Также можно измерять CH_{50} , AH_{50} , образование тромбов и/или лактатдегидрогеназу (LDH) в сыворотке образца, например, крови или образце печени. Подходящие анализы дополнительно описаны в разделе примеров ниже.

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 испытании иРНК и способов, описанных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, которые упоминаются в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта, настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

Примеры

Пример 1. Синтез иРНК.

Происхождение реагентов.

Если происхождение реагента конкретно не приведено в данном документе, такой реагент можно получать от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартным качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Транскрипты.

Осуществляли конструирование siRNA для идентификации siRNA, нацеленной на транскрипты C5 человека, макак резус (*Macaca mulatta*), мыши, крысы, отмеченных в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции RefSeq NCBI: человека - NM_001735.2; макак резус - XM_001095750.2; мыши - NM_010406.2; крысы - XM_345342.4. Дуплексы siRNA конструировали в нескольких отдельных партиях, включая без ограничения партии, содержащие дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и макак резус; только транскриптам человека, макак резус и мыши; только транскриптам человека, макак резус, мыши и крысы; и только транскриптам мыши и крысы. Все дуплексы siRNA конструировали с получением 100% идентичности с указанным транскриптом человека и транскриптов других видов, рассмотренных в каждой партии конструкции (выше).

Конструирование siRNA, специфичность и прогноз эффективности.

Прогнозируемую специфичность всех возможных 19mers предсказывали из каждой последовательности. Затем отбирали 19mers кандидаты, не имеющих повторы более, чем 7 нуклеотидов. Эти 2971 кан-

дидата человек/макак резус, 142 человек/макак резус/мышь, 54 человек/макак резус/мышь/крыса и 807 мышь/крыса применяли в обширных исследованиях к соответствующим транскриптомам (определенным, как набор записей NM_ и XM_ в пределах наборов RefSeq NCBI человека, макака резуса, собаки, мыши или крысы), с применением исчерпывающего алгоритма "полный перебор", реализованного в питон-скрипте "BruteForce.py". Далее скрипт разбирали на транскрипт-олиго выравнивания для создания показателя на основе положения и числа несоответствий между siRNA и любым потенциальным 'нецелевым' транскриптом. Нецелевой показатель взвешивали, чтобы подчеркнуть различия в "исходном" участке siRNAs, в положениях 2-9 от 5'-конца молекулы.

Каждая пара олиго-транскрипт из полного перебора получала значение несовпадения путем суммирования индивидуальных баллов несовпадения; несовпадения в положении 2-9 считали как 2,8, несовпадения в положениях сайта расщепления 10-11 считали как 1,2, и несовпадения в участке 12-19 считали как 1,0. Дополнительное нецелевое предсказание осуществляли путем сравнения частоты гептамеров и октомеров, полученных из 3 различных, производных исходных гексамеров каждого олигонуклеотида. Гексамеры с позиций 2-7 по отношению к началу 5' применяли для создания 2 гептамеров и одного октамера. "Гептамер 1" создавали путем добавления 3'-А к гексамеру; гептамер 2 создавали путем добавления 5'-А к гексамеру; октомер создавали путем добавления А и к 5'-, и к 3'-концам гексамера. Предварительно рассчитывали частоту октамеров и гептамеров в 3'-UTRome человека, макака-резуса, мыши или крысы (определяется как подпоследовательность транскриптома из базы данных RefSeq NCBI, где конец кодирующего участка, "CDS", четко определен). Частоту октамера приводили в соответствие с частотой гептамера, используя среднее значение из диапазона частот октамера. Затем рассчитывали "mirSeedScore" путем расчета суммы (3 X подсчет приведенного в соответствие октамера) (2 X подсчет гептамера 2) (1 X подсчет гептамера 1)).

Обе цепи siRNA назначали к категории спецификации в соответствии с расчетными баллами: оценка выше 3 квалифицируется как весьма специфическая, при значении 3 как специфическая, и между 2,2 и 2,8 как умеренно специфическая. Дуплексы сортировали по специфике антисмысловой цепи и отбирали те дуплексы, чьи антисмысловые олигонуклеотиды не содержали GC в первом положении, не содержали G в обоих положениях 13 и 14, и содержали 3 или больше U или A в исходном участке.

Для GalNaC-конъюгированных дуплексов конструировали смысловой 21mer и антисмысловый 23mer олигонуклеотиды путем расширения антисмысловых 19mers (описано выше) до 23 нуклеотидов в целевой комплементарной последовательности. Все виды транскриптов, включенные в конструкцию партии, проверяли на комплементарность. Применяли только 23mers, сохранившие 100% комплементарность последовательности по меньшей мере у 2 видов. Для каждого дуплекса определяли смысловые 21mer как обратную комплементарность первых 21 нуклеотидов антисмысловой цепи.

Выбор последовательности siRNA.

Синтезировали и формировали в дуплексы в общей сложности 23 смысловых и 23 антисмысловых, полученных от человек/макак резус, 6 смысловых и 6 антисмысловых, полученных от человек/макак резус/мышь/крыса, и 13 смысловых и 13 антисмысловых, полученных от мышь/крыса, олигомеров siRNA 19mer.

Вышеуказанные наборы 19mer расширяли до дуплексов 21/23mer для GalNaC-конъюгированной конструкции и повторно классифицировали в соответствии с их новыми видовыми соответствиями. Двадцать семь смысловых и 27 антисмысловых, полученных из человек/макак резус, 1 смысловой и 1 антисмысловой, полученных из человек/макак резус/мышь, 3 смысловых и 3 антисмысловых, полученных из человек/макак резус/крыса, 4 смысловых и 4 антисмысловых, полученных из человек/макак резус/мышь/крыса, и 13 смысловых и 13 антисмысловых, полученных из мышь/крыса 21mer (смыслового) и 23mer (антисмыслового) олигонуклеотидов синтезировали и формировали в дуплексы.

Подробный список последовательностей смысловых и антисмысловых цепей C5 приведены в табл. 3-6.

Синтез siRNA.

Общие способы синтеза РНК малого и среднего размера.

РНК-олигонуклеотиды синтезировали в масштабах между 0,2-500 мкмоль с применением коммерчески доступных 5'-О-(4,4'-диметокситриил)-2'-О-*t*-бутилдиметилсиллил-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил) фосфорамидит-мономеров уридина, 4-N-ацетилцитидин, 6-N-бензоиладенозина и 2-N-изобутиргуанозина и соответствующих 2'-О-метил и 2'-фторфосфорамидитов, согласно стандартным протоколам синтеза олигонуклеотидов в твердой фазе. Растворы амидита готовили в концентрации 0,1-0,15 М и применяли 5-этилтио-1Н-тетразол (0,25-0,6 М в ацетонитриле) в качестве активатора. В процессе синтеза вводили фосфотиоатные модификации остова с применением 0,2 М фенилацетил дисульфида (PADS) в лутидин:ацетонитрил (1:1) (об.:об.) или 0,1 М 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дигидро-5 тиона (DDTT) в пиридине для стадии окисления. После завершения синтеза последовательности отщепляли от твердой подложки и снимали защиту с применением метиламина с последующим триметиламино ЗНФ для удаления присутствующих 2'-О-*t*-бутилдиметилсиллил-защитных групп.

Для масштабного синтеза между последовательностей (5-500 мкмоль и полностью 2'-модифицированных 2'-фтор и/или 2'-О-метил или их комбинации), у олигонуклеотидов удаляли защитную группу с применением 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака либо при

35°C 16 ч, или при 55°C в течение 5,5 ч. Перед удалением защитной группы аммиака олигонуклеотиды обрабатывали 0,5 М пиперидином в ацетонитриле в течение 20 мин на твердой подложке. Неочищенные олигонуклеотиды анализировали с помощью LC-MS и анионообменной HPLC (IEX-HPLC). Очистку олигонуклеотидов проводили с помощью IEX HPLC в применении: 20 мМ фосфата, 10%-15% ACN, pH 8,5 (буфер А) и 20 мМ фосфата, 10%-15% ACN, 1 М NaBr, pH 8,5 (буфер В). Фракции анализировали на чистоту с помощью аналитической HPLC. Содержащие продукт фракции с приемлемой чистотой объединяли и концентрировали на роторном испарителе до обессоливания. Образцы обессоливали с помощью эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Равные молярные количества смысловых и антисмысловых цепей отжигали в 1х PBS-буфере с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Для малых масштабов (0,2-1 мкмоль) синтез проводили на синтезаторе MerMade 192 в формате 96 лунок. В случае полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор и/или 2'-О-метил или их комбинаций), у олигонуклеотидов удаляли защитную группу с применением метиламина при комнатной температуре в течение 30-60 мин с последующей инкубацией при 60°C в течение 30 мин или с применением 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака при комнатной температуре в течение 30-60 мин с последующей инкубацией при 40°C в течение 1,5 ч. Неочищенные олигонуклеотиды затем осаждали в растворе ацетонитрил:ацетон (9:1) и выделяли центрифугированием и декантацией супернатанта. Неочищенный олигонуклеотидный осадок ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и анализировали с помощью LC-MS и анионообменной HPLC. Неочищенные олигонуклеотидные последовательности обессоливали в глубоких 96-луночных планшетах на колонке HiTrap Sephadex G25 5 мл (GE Healthcare). Из каждой лунки отбирали 1,5 мл образцов, соответствующих индивидуальной последовательности. Эти очищенные обессоленные олигонуклеотиды анализировали с помощью LC-MS и анионообменной хроматографии. Дуплексы получали путем отжига эквимоларных количеств смысловых и антисмысловых последовательностей на работе Tescan. Концентрацию дуплексов доводили до 10 мкМ в 1х PBS-буфере.

Синтез GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов для анализа *in vivo*.

Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандом GalNAc на их 3'-конце, синтезировали в масштабах между 0,2-500 мкмоль с применением твердой подложки, предварительно загруженной Y-образной линкером, несущим 4,4-диметокситритил (DMT)-защитную первичную группу гидрокси для синтеза олигонуклеотида и GalNAc-лиганда, присоединенного через фрагмент.

Для синтеза конъюгатов GalNAc в масштабах между 5-500 мкмоль, указанный протокол синтеза РНК дополняли следующими модификациями: Для подложек синтеза на основе полистирола применяли 5% дихлоруксусную кислоту в толуоле для DMT-расщепления в процессе синтеза. Отщепление от подложки и удаление защиты проводили, как описано выше. Фосфотиоатно-богатые последовательности (обычно >5 фосфотиоатов) синтезированы без удаления конечной 5'-DMT-группы ("с DMT") и после расщепления и удаления защитной группы, как описано выше, очищали с помощью обращенно-фазовой HPLC с применением 50 мМ ацетата аммония в воде (буфер А) и 50 мМ ацетат аммония в 80% ацетонитриле (буфер В). Фракции анализировали на чистоту с помощью аналитической HPLC и/или LC-MS. Содержащие продукт фракции с приемлемой чистоты, объединяли и концентрировали на роторном испарителе. DMT-группу удаляли с применением 20-25% уксусной кислоты в воде до завершения процесса. Образцы обессоливали с помощью эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Равные молярные количества смысловых и антисмысловых цепей отжигали в 1х PBS-буфере с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Для синтеза малых масштабов конъюгатов GalNAc (0,2-1 мкмоль), включая последовательности с несколькими фосфотиоатными связями, применяли протоколы, описанные выше для синтеза РНК или полностью 2'-F/2'-ОМе-содержащих последовательностей на платформе MerMade. Синтез проводили на предварительно упакованных колонках, содержащих GalNAc-функционализированную управляемую подложку со стеклянными порами.

Пример 2. Скрининг *in vitro*.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Hep3B (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной поддерживающей среде Игла (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Клетки промывали и ресуспендировали до 0,25×10⁶ клеток/мл. Во время трансфекций клетки высевали на 96-луночный планшет с приблизительно 20000 клеток на лунку.

Первичные гепатоциты мыши (PMH) выделяли непосредственно перед процедурой из самок мышей линии C57BL/6 (Charles River Laboratories International, Inc. Willmington, MA), меньше чем за 1 ч до трансфекций, и выращивали в среде первичных гепатоцитов. Клетки ресуспендировали до 0,11×10⁶ клеток/мл в среде InVitroGRO CP Rat (покрытие) (Celsis In Vitro Technologies, номер по каталогу S01494). Во время трансфекций клетки высевали на 96-луночный коллагеновый планшет BD Bioscoat (BD, 356407), 10000 клеток на лунку, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Криоконсервированные первичные гепатоциты яванского макака (Celsis B Vitro Technologies, M003055-P) оттаивали при 37°C на водяной бане непосредственно перед применением и ресуспендировали до $0,26 \times 10^6$ клеток/мл в среде InVitroGRO CP (покрытие) (Celsis B Vitro Technologies, номер по каталогу Z99029). Во время трансфекций клетки высевали на 96-луночный коллагеновый планшет BD Bio-coat (BD, 356407), 25000 клеток на лунку, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для Hep3В, РМН и первичных гепатоцитов Супомолгус, трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл of Opti-MEM с 0,2 мкл RNAiMax липофектамина на лунку (Invitrogen, Карлсбад Калифорния, номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. 80 мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих соответствующее количество клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК.

Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ для GalNAc-модифицированных последовательностей или при конечной концентрации дуплекса 1 нМ и 0,01 нМ для всех других последовательностей. Эксперименты зависимости дозы-ответ проводили при 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412 и 0,00137 нМ конечной концентрации дуплекса для первичных гепатоцитов мыши и при 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412, 0,00137, 0,00046, 0,00015, 0,00005 и 0,000017 нМ конечной концентрации дуплекса для клеток Hep3В.

Трансфекция посредством свободного поглощения.

Эксперименты свободного поглощения проводили путем добавления 10 мкл дуплексов siRNA в PBS на лунку в 96-луночный планшет. 90 мкл полной среды роста, содержащей соответствующее количество клеток для типа клеток, затем добавляли к siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 500 нМ и 5 нМ и эксперименты в отношении эффекта дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 1000, 333, 111, 37, 12,3, 4,12, 1,37, 0,46 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). 10 мкл 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 фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Наконец, 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 45 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)

Готовили мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию. Равные объемы мастер-микса и РНК смешивали до конечного объема 12 мкл для *in vitro* скрининга или 20 мкл для *in vivo* скрининга образцов. кДНК получали с применением термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C в течение 10 мин, 37°C в течение 120 мин, 85°C в течение 5 с и хранение при 4°C.

PCR в режиме реального времени.

2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 2 мкл H₂O, 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Life Technologies, номер по каталогу 4326317E для клеток Hep3В, номер по каталогу 352339E для первичных гепатоцитов мыши или обычного зонда для первичных гепатоцитов макаков-крабоеда), 0,5 мкл зонда TaqMan для C5 (Life Technologies, номер по каталогу Hs00156197_m1 для Hep3В клеток или mm00439275_m1 для первичных гепатоцитов мыши или обычного зонда для первичных гепатоцитов яванского макака) и 5 мкл зонда мастер-микс LightCycler 480 (Roche, номер по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, номер по каталогу 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением $\Delta\Delta C_t$ (RQ)-анализа. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс испытывали с двумя биологическими повторами, если не указано иное, и каждый раз PCR в режиме реального времени проводили в одинаковых технических повторях. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс испытывали в одном или нескольких экспериментах (3 мыши на группу) и каждый раз PCR в режиме реального времени проводили в одинаковых технических повторях.

Для вычисления относительного кратного изменения в уровнях мРНК C5, данные в реальном времени анализировали с применением $\Delta\Delta C_t$ -способа и нормализовали в соответствии с данными анализов, выполненных с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками. IC_{50} вычисляли с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с таковыми для клеток, трансфицированных AD-1955 в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

Смысловая и бессмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

СМЫСЛОВАЯ: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 13);

АНТИСМЫСЛОВАЯ: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 14).

Табл. 7 показывает результаты теста разовой дозы в клетках Hep3В, трансфицированных указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

Табл. 8 показывает результаты теста трансфекции разовой дозы в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

Табл. 9 показывает результаты теста свободного поглощения разовой дозы в первичных гепатоцитах яванского макака указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

Табл. 10 показывает результаты теста свободного поглощения разовой дозы в первичных гепатоцитах мыши указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

Табл. 11 показывает зависимость доза-ответ в тесте свободного поглощения в первичных гепатоцитах яванского макака указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Указанные значения IC_{50} представляют значения IC_{50} относительно необработанных клеток.

Табл. 12 показывает зависимость доза-ответ в тесте свободного поглощения в первичных гепатоцитах мыши указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Указанные значения IC_{50} представляют значения IC_{50} относительно необработанных клеток.

Табл. 13 показывает результаты теста разовой дозы в клетках Hep3В, трансфицированных указанными модифицированными и немодифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам. Доза 0,01 нМ представляла собой разовую биологическую трансфекцию и доза 1 нМ представляла собой повторную биологическую трансфекцию.

Табл. 14 показывает результаты теста разовой дозы в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными модифицированными и немодифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

Табл. 15 показывает зависимость доза-ответ в клетках Hep3В, трансфицированных указанными модифицированными и немодифицированными иРНК. Указанные значения IC_{50} представляют значения IC_{50} относительно необработанных клеток.

Табл. 16 показывает зависимость доза-ответ в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными модифицированными и немодифицированными иРНК. Указанные значения IC_{50} представляют значения IC_{50} относительно необработанных клеток.

Таблица 2

Сокращения нуклеотидных мономеров, применяемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями

Сокращение	Нуклеотид (ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат

Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-O-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-O-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис (GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4-гидроксипролинол-Нур-(GalNAc-алкил)3
(dt)	дезокситимин

Таблица 3

Последовательности немодифицированной смысловой и антисмысловой цепи dsRNA C5

ID дуплекса	Смысловая нить	Смысловая немодифицированная последовательность	SEQ ID NO:	Анти-смысловая	Антисмысловая немодифицированная последовательность	SEQ ID NO:	Виды_название олигонуклеотида ¹
AD-58093.1 ² UM ³	A-118310.1	AAUAACUCACUA UAAUUACUU	15	A-118311.1	AAGUAAUUUAGUG AGUUUUUUU	66	NM_001735.2_151 7-1539_as
AD-58099.1 UM	A-118312.1	UGACAAAUAAC UCACUAUAA	16	A-118313.1	UUUAGUGAGUUU UUUGUCAU	67	NM_001735.2_151 1-1533_as
AD-58105.1 UM	A-118314.1	CUUCCUCUGGAA AUUGGCCUU	17	A-118315.1	AAGGCCAAUUCCA GAGGAAGCA	68	NM_001735.2_273 3-2755_as
AD-58111.1 UM	A-118316.1	GACAAAUAACU CACUAUAAU	18	A-118317.1	AUUUAGUGAGUUA UUUUGUCA	69	NM_001735.2_151 2-1534_as

AD-58117.1 UM	A-118318.1	UCCUCUGGAAAU UGGCCUUCA	19	A-118319.1	UGAAGGCCAAUUUC CAGAGGAAG	70	NM_001735.2_273 5-2757_as
AD-58123.1 UM	A-118320.1	AAGCAAGAUUUU UUUAUAAUA	20	A-118321.1	UUUUUAAAAAUU CUUGCUUUU	71	NM_001735.2_784 -806_as
AD-58129.1 UM	A-118322.1	AAAAUGUUUUUG UCAAGUACA	21	A-118323.1	UGUACUUGACAAA ACAUUUUCU	72	NM_001735.2_474 4-4766_as
AD-58088.1 UM	A-118324.1	AUUUAAACAACA AGUACCUUU	22	A-118325.1	AAAGGUACUUGUUG UUUAAAUCU	73	NM_001735.2_982 -1004_as
AD-58094.1 UM	A-118326.1	AUUCAGAAAGUC UGUGAAGGA	23	A-118327.1	UCCUUCACAGACUU UCUGAAUUU	74	NM_001735.2_457 8-4600_as
AD-58100.1 UM	A-118328.1	ACACUGAAGCAU UUGAUGCAA	24	A-118329.1	UUGCAUCAAUGCU UCAGUGUAU	75	NM_001735.2_169 -191_as
AD-58106.1 UM	A-118330.1	GCAGUUCUGUGU UAAAUGUC	25	A-118331.1	GACAUUUUACACA GAACUGCAU	76	NM_001735.2_259 1-2613_as
AD-58112.1 UM	A-118332.1	AGGAUUUUGAGU GUAAAAGGA	26	A-118333.1	UCCUUUUACACUCA AAAUCUUU	77	NM_001735.2_295 5-2977_as
AD-58118.1 UM	A-118334.1	AAUGAUGAACCU UGUAAAAGAA	27	A-118335.1	UUUUUACAAGGUU CAUCAUUU	78	NM_001735.2_202 5-2047_as
AD-58124.1 UM	A-118336.1	AUCAUUGGAACA UUUUUCAUU	28	A-118337.1	AAUGAAAAUGUUC CAAUGAUUU	79	NM_001735.2_311 8-3140_as
AD-58130.1 UM	A-118338.1	AGCCAGAAAUUC GGAGUUUUU	29	A-118339.1	AAUAACUCCGAAUU UCUGGCUUG	80	NM_001735.2_231 7-2339_as
AD-58089.1 UM	A-118340.1	UCCUGGGAGAU AAAACUCAC	30	A-118341.1	GUGAGUUUUUCUC CCAGGGAAA	81	NM_001735.2_361 8-3640_as
AD-58095.1 UM	A-118342.1	GAAAUGAUGAA CCUUGUAAA	31	A-118343.1	UUUACAAGGUUCAU CAUUUUCUU	82	NM_001735.2_202 2-2044_as
AD-58101.1 UM	A-118344.1	AUUGCUCUAGUC ACAUUUGAU	32	A-118345.1	AUCAAAUGUGACUU GAGCAAUUC	83	NM_001735.2_918 -940_as
AD-58107.1 UM	A-118346.1	GAGAUUGCAUUA GCUUAUAAA	33	A-118347.1	UUUUAAGCAUAUG CAAUCUCUG	84	NM_001735.2_469 8-4720_as
AD-58113.1 UM	A-118348.1	GUUAUCCUGAUA AAAAUUUA	34	A-118349.1	UAAAUUUUUUAUCA GGAUAAUCU	85	NM_001735.2_205 -227_as
AD-58119.1 UM	A-118350.1	AGGAAGUUUGCA GCUUUUAUU	35	A-118351.1	AAUAAAAGCUGCAA ACUUCUCA	86	NM_001735.2_414 7-4169_as
AD-58125.1 UM	A-118352.1	GAAGAAUUGAU CAUAUUGGA	36	A-118353.1	UCCAAUAUGAUCAA UUUCUUCUA	87	NM_001735.2_555 -577_as
AD-58131.1 UM	A-118354.1	AUCCUGAUAAAA AAUUUAGUU	37	A-118355.1	AACUAAUUUUUUA UCAGGAUAA	88	NM_001735.2_208 -230_as
AD-58090.1 UM	A-118356.1	UGGAAAAGAAAU CUUAGUAAA	38	A-118357.1	UUUACUAAGAUUUC UUUCCAAA	89	NM_001735.2_278 6-2808_as
AD-58096.1 UM	A-118358.1	UCUUUACAAGU AUAAAACAU	39	A-118359.1	AAUGUUUAUCUUU GAUAAGAUG	90	NM_001735.2_159 6-1618_as
AD-58102.1 UM	A-118360.1	UCCCUACAACU GAAUUUGGU	40	A-118361.1	ACCAAUUUCAGUUU GUAGGGAGA	91	NM_001735.2_108 2-1104_as

AD-58108.1 UM	A-118362.1	CAGGAGCAAACA UAUGUCAUU	41	A-118363.1	AAUGACAUUGUUU GCUCUGUC	92	NM_001735.2_87- 109_as
AD-58114.1 UM	A-118364.1	ACAUGUAACAAC UGUAGUUCA	42	A-118365.1	UGAACUACAGUUGU UACAUGUAC	93	NM_001735.2_410 9-4131_as
AD-58120.1 UM	A-118366.1	CAGGAAAUCAUU GGAACAUUU	43	A-118367.1	AAAUGUCCAAUGA UUUCCUGUU	94	NM_001735.2_311 2-3134_as
AD-58126.1 UM	A-118368.1	UUUAAGAAUUUU GAAUUACU	44	A-118369.1	AGUAAUUUCAAUU UCUUAAAGU	95	NM_001735.2_759 -781_as
AD-58132.1 UM	A-118370.1	UAUUCUGCAACU GAAUUCGAU	45	A-118371.1	AUCGAAUUCAGUUG CAGAAUAC	96	NM_001735.2_441 2-4434_as
AD-58091.1 UM	A-118372.1	GCCCUUGGAAAG AGUAUUUCA	46	A-118373.1	UGAAAUACUCUUUC CAAGGGCUU	97	NM_001735.2_188 6-1908_as
AD-58097.1 UM	A-118374.1	CCUGAUAAAAAA UUUAGUUC	47	A-118375.1	GUAACUAAAAUUUU UAUCAGGAU	98	NM_001735.2_210 -232_as
AD-58103.1 UM	A-118376.1	CCCUUGGAAAGA GUUUUCA	48	A-118377.1	UUGAAAUACUCUUU CCAAGGGCU	99	NM_001735.2_188 7-1909_as
AD-58121.1 UM	A-118382.1	UGCAGAUCAAAC ACAAUUUCA	49	A-118383.1	UGAAAUUGUGUUUG AUCUGCAGA	100	NM_010406.2_494 3-4965_as
AD-58133.1 UM	A-118386.1	CAGAUCAAACAC AAUUUCAGU	50	A-118387.1	ACUGAAAUUGUGUU UGAUCUGCA	101	NM_010406.2_494 5-4967_as
AD-58116.1 UM	A-118396.1	GUUCCGGAUUAU UGAACUUUU	51	A-118397.1	AAAAGUCAAUAU CCGGAACCG	102	NM_010406.2_450 0-4522_as
AD-58644.1 UM	A-119328.1	AUUUAAACAACA AGUACUUUU	52	A-119329.1	AAAGGUACUUGUUG UUUAAAUCU	103	NM_001735.2_982 -1004_as
AD-58651.1 UM	A-119328.2	AUUUAAACAACA AGUACUUUU	53	A-119339.1	AAAGGUACUUGUUG UUUAAAUCU	104	NM_001735.2_982 -1004_as
AD-58641.1 UM	A-119322.1	UGACAAAUAAC UCACUAUAA	54	A-119323.1	UUUAUGAGUUUAU UUUGUCAAU	105	NM_001735.2_151 1-1533_as
AD-58648.1 UM	A-119322.2	UGACAAAUAAC UCACUAUAA	55	A-119336.1	UUUAUGAGUUUAU UUUGUCAAU	106	NM_001735.2_151 1-1533_as
AD-58642.1 UM	A-119324.1	GACAAAUAACU CACUAUAAU	56	A-119325.1	AUUUAUGAGUUUA UUUUGUCA	107	NM_001735.2_151 2-1534_as
AD-58649.1 UM	A-119324.2	GACAAAUAACU CACUAUAAU	57	A-119337.1	AUUUAUGAGUUUA UUUUGUCA	108	NM_001735.2_151 2-1534_as
AD-58647.1 UM	A-119334.1	GUUCCGGAUUAU UGAACUUUU	58	A-119335.1	AAAAGUCAAUAU CCGGAACCG	109	NM_010406.2_450 0-4522_as
AD-58654.1 UM	A-119334.2	GUUCCGGAUUAU UGAACUUUU	59	A-119342.1	AAAAGUCAAUAU CCGGAACCG	110	NM_010406.2_450 0-4522_as
AD-58645.1 UM	A-119330.1	UGCAGAUCAAAC ACAAUUUCA	60	A-119331.1	UGAAAUUGUGUUUG AUCUGCAGA	111	NM_010406.2_494 3-4965_as
AD-58652.1 UM	A-119330.2	UGCAGAUCAAAC ACAAUUUCA	61	A-119340.1	UGAAAUUGUGUUUG AUCUGCAGA	112	NM_010406.2_494 3-4965_as
AD-58643.1 UM	A-119326.1	AAGCAAGAUUAU UUUAUAUA	62	A-119327.1	UAUUUAUUUUUAU CUUGCUUUU	113	NM_001735.2_784 -806_as
AD-58650.1 UM	A-119326.2	AAGCAAGAUUAU UUUAUAUA	63	A-119338.1	UAUUUAUUUUUAU CUUGCUUUU	114	NM_001735.2_784 -806_as
AD-58646.1 UM	A-119332.1	CAGAUCAAACAC AAUUUCAGU	64	A-119333.1	ACUGAAAUUGUGUU UGAUCUGCA	115	NM_010406.2_494 5-4967_as
AD-58653.1 UM	A-119332.2	CAGAUCAAACAC AAUUUCAGU	65	A-119341.1	ACUGAAAUUGUGUU UGAUCUGCA	116	NM_010406.2_494 5-4967_as

¹ Название вида олигонуклеотида отражает запись GenBank (например, NM_001735.2) и положение в нуклеотидной последовательности записи GenBank (например, 1517-1539), на которую нацелена антисмысловая цепь.

² Число, следующее после десятичной точки, относится к номеру партии.

³ NM = Немодифицированный.

Последовательности модифицированной GalNAC-конъюгированной и антисмысловой цепи dsRNA C5

ID дуп-лекса	Смысловая нить	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Анти-смысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Виды_название олигонуклеотида ⁴
AD-58093.1	A-118310.1	AfaUfaAfcUfcAfcUfaUfaAfuUfaCfuUfL96	117	A-118311.1	aAfgUfaAfuUfaUfaguGfaGfuUfaUfusUfsu	168	
AD-58099.1	A-118312.1	UfgAfcAfaAfaUfAfAfcUfcAfcUfaUfaAfL96	118	A-118313.1	uUfaUfaGfuGfaGfuuaUfuUfuGfuCfasAfsu	169	
AD-58105.1	A-118314.1	CfuUfcCfuCfuGfGfAfaAfuUfgGfcCfuUfL96	119	A-118315.1	aAfgGfcCfaAfuUfuccAfgAfgGfaAfgsCfsa	170	
AD-58111.1	A-118316.1	GfaCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	120	A-118317.1	aUfuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsAfsa	171	
AD-58117.1	A-118318.1	UfcCfuCfuGfgAfAfAfuUfgGfcCfuUfcAfL96	121	A-118319.1	uGfaAfgGfcCfaAfuuuCfcAfgAfgGfasAfsu	172	
AD-58123.1	A-118320.1	AfaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	122	A-118321.1	uAfuUfaUfaAfaAfauuUfcUfuGfcUfusUfsu	173	
AD-58129.1	A-118322.1	AfaAfaUfgUfuUfUfUfgUfcAfaGfuAfcAfL96	123	A-118323.1	uGfuAfcUfuGfaCfaaaAfaCfaUfuUfusCfsu	174	
AD-58088.1	A-118324.1	AfuUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	124	A-118325.1	aAfaGfgUfaCfuUfguuGfuUfuAfaAfusCfsu	175	
AD-58094.1	A-118326.1	AfuUfcAfgAfaAfgUfcUfgUfgAfaGfgAfL96	125	A-118327.1	uCfcUfuCfaCfaGfacuUfuCfuGfaAfusUfsu	176	
AD-58100.1	A-118328.1	AfcAfcUfgAfaGfCfAfuUfuGfaUfgCfaAfL96	126	A-118329.1	uUfgCfaUfcAfaAfgucUfuCfaGfuGfusAfsu	177	
AD-58106.1	A-118330.1	GfcAfgUfuCfuGfUfgfuUfaAfaAfuGfuCfL96	127	A-118331.1	gAfcAfuUfuUfaAfcacAfgAfaCfuGfcsAfsu	178	
AD-58112.1	A-118332.1	AfgGfaUfuUfuGfAfGfuGfuAfaAfaGfgAfL96	128	A-118333.1	uCfcUfuUfuAfcAfcucAfaAfaUfcCfusUfsu	179	
AD-58118.1	A-118334.1	AfaUfgAfuGfaAfcCfCfuUfgUfaAfaGfaAfL96	129	A-118335.1	uUfcUfuUfaCfaAfgguUfcAfuCfaUfusUfsu	180	
AD-58124.1	A-118336.1	AfuCfaUfuGfgAfAfCfaUfuUfuUfcAfuUfL96	130	A-118337.1	aAfuGfaAfaAfaUfguuCfcAfaUfgAfusUfsu	181	
AD-58130.1	A-118338.1	AfgCfcAfgAfaAfUfUfcGfgAfgUfuAfuUfL96	131	A-118339.1	aAfuAfaCfuCfcGfaauUfuCfuGfgCfusUfsg	182	
AD-58089.1	A-118340.1	UfcCfcUfgGfgAfGfAfuAfaAfaCfuCfaCfL96	132	A-118341.1	gUfgAfgUfuUfuAfcuUfcCfaGfgGfasAfsa	183	

AD-58095.1	A-118342.1	GfaAfaAfuGfaUfGfAfa CfcUfuGfuAfaAfL96	133	A-118343.1	uUfuAfcAfaGfgUfucaUfc AfuUfuUfcsUfsu	184	
AD-58101.1	A-118344.1	AfuUfgCfuCfaAfgUfc AfcAfuUfuGfaUfL96	134	A-118345.1	aUfcAfaAfuGfuGfacuUfg AfgCfaAfusUfsc	185	
AD-58107.1	A-118346.1	GfaGfaUfuGfcAfUfAfu GfcUfuAfuAfaAfL96	135	A-118347.1	uUfuAfuAfaGfcAfuauGfc AfaUfcUfcsUfsg	186	
AD-58113.1	A-118348.1	GfuUfaUfcCfuGfAfUfa AfaAfaAfuUfuAfL96	136	A-118349.1	uAfaAfuUfuUfuUfaucAfg GfaUfaAfcUfsu	187	
AD-58119.1	A-118350.1	AfgGfaAfgUfuUfGfCfa GfcUfuUfuAfuUfL96	137	A-118351.1	aAfuAfaAfaGfcUfgcaAfa CfuUfcCfusCfsa	188	
AD-58125.1	A-118352.1	GfaAfgAfaAfuUfGfAfu CfaUfaUfuGfgAfL96	138	A-118353.1	uCfcAfaUfaUfgAfucaAfu UfuCfuUfcsUfsa	189	
AD-58131.1	A-118354.1	AfuCfcUfgAfuAfAfAfa AfaUfuUfaGfuUfL96	139	A-118355.1	aAfcUfaAfaUfuUfuuuAfu CfaGfgAfusAfsa	190	
AD-58090.1	A-118356.1	UfgGfaAfaAfgAfAfAfu CfuUfaGfuAfaAfL96	140	A-118357.1	uUfuAfcUfaAfgAfuuuCfu UfuUfcCfasAfsa	191	
AD-58096.1	A-118358.1	UfcUfuAfuCfaAfAfGfu AfuAfaAfcAfuUfL96	141	A-118359.1	aAfuGfuUfuAfuAfcuuUfg AfuAfaGfasUfsg	192	
AD-58102.1	A-118360.1	UfcCfcUfaCfaAfAfCfu GfaAfuUfuGfgUfL96	142	A-118361.1	aCfcAfaAfuUfcAfguuUfg UfaGfgGfasGfsa	193	
AD-58108.1	A-118362.1	CfaGfgAfgCfaAfAfCfa UfaUfgUfcAfuUfL96	143	A-118363.1	aAfuGfaCfaUfaUfguuUfg CfuCfcUfgsUfsc	194	
AD-58114.1	A-118364.1	AfcAfuGfuAfaCfAfAfc UfgUfaGfuUfcAfL96	144	A-118365.1	uGfaAfcUfaCfaGfuugUfu AfcAfuGfusAfsa	195	
AD-58120.1	A-118366.1	CfaGfgAfaAfuCfAfUfu GfgAfaCfaUfuUfL96	145	A-118367.1	aAfaUfgUfuCfcAfaugAfu UfuCfcUfgsUfsu	196	
AD-58126.1	A-118368.1	UfuUfaAfgAfaUfUfUfu GfaAfaUfuAfcUfL96	146	A-118369.1	aGfuAfaUfuUfcAfaaaUfu CfuUfaAfasGfsu	197	
AD-58132.1	A-118370.1	UfaUfuCfuGfcAfAfCfu GfaAfuUfcGfaUfL96	147	A-118371.1	aUfcGfaAfuUfcAfguuGfc AfgAfaUfasAfsa	198	
AD-58091.1	A-118372.1	GfcCfcUfuGfgAfAfAfg AfgUfaUfuUfcAfL96	148	A-118373.1	uGfaAfaUfaCfuCfuuuCfc AfaGfgGfcsUfsu	199	
AD-58097.1	A-118374.1	CfcUfgAfuAfaAfAfAfa UfuUfaGfuUfaCfL96	149	A-118375.1	gUfaAfcUfaAfaUfuuuUfuAf uCfaGfgsAfsu	200	
AD-58103.1	A-118376.1	CfcCfuUfgGfaAfAfGfa GfuAfuUfuCfaAfL96	150	A-118377.1	uUfgAfaAfuAfcUfcuuUfcCfa AfgGfgsCfsu	201	
AD-58121.1	A-118382.1	UfgCfaGfaUfcAfAfAfc AfcAfaUfuUfcAfL96	151	A-118383.1	uGfaAfaUfuGfuGfuuuGfaUfc UfgCfasGfsa	202	
AD-58133.1	A-118386.1	CfaGfaUfcAfaAfcAfc AfaUfuUfcAfgUfL96	152	A-118387.1	aCfuGfaAfaUfuGfuguUfuGfa UfcUfgsCfsa	203	
AD-58116.1	A-118396.1	GfuUfcCfgGfaUfAfUfu UfgAfaCfuUfuUfL96	153	A-118397.1	aAfaAfgUfuCfaAfaaaUfcCfg GfaAfcCfsg	204	
AD-58644.1	A-119328.1	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfa AfgUfaCfcUfuUfL96	154	A-119329.1	asAfsaGfgUfaCfuUfguuGfu UfuAfaAfuscsu	205	

AD-58651.1	A-119328.2	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	155	A-119339.1	asAfsaGfsgUfsaCfsuUfsguuGfsuUfsuAfsaAfsuscsu	206	
AD-58641.1	A-119322.1	UfsgsAfcAfaAfaUfAfAfcUfcAfcUfaUfaAfL96	156	A-119323.1	usUfsaUfaGfuGfaGfuuaUfuUfuGfuCfasasu	207	
AD-58648.1	A-119322.2	UfsgsAfcAfaAfaUfAfAfcUfcAfcUfaUfaAfL96	157	A-119336.1	usUfsaUfsaGfsuGfsaGfsuuaUfsuUfsuGfsuCfsasasu	208	
AD-58642.1	A-119324.1	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	158	A-119325.1	asUfsuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsasa	209	
AD-58649.1	A-119324.2	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	159	A-119337.1	asUfsuAfsuAfsuUfsgUfsgAfsuuAfsuUfsuUfsgUfscsasa	210	
AD-58647.1	A-119334.1	GfsusUfcCfGfGfaUfAfUfuUfgAfaCfuUfuUfL96	160	A-119335.1	asAfsaAfgUfuCfaAfauaUfcCfGfGfaAfcscsg	211	
AD-58654.1	A-119334.2	GfsusUfcCfGfGfaUfAfUfuUfgAfaCfuUfuUfL96	161	A-119342.1	asAfsaAfsuUfsuUfsgUfsgUfscsasa	212	
AD-58645.1	A-119330.1	UfsgsCfaGfaUfcAfAfAfcAfcAfaUfuUfcAfL96	162	A-119331.1	usGfsaAfaUfuGfuGfuuuGfaUfcUfgCfasgsa	213	
AD-58652.1	A-119330.2	UfsgsCfaGfaUfcAfAfAfcAfcAfaUfuUfcAfL96	163	A-119340.1	usGfsaAfsaUfsuUfsgUfsgUfscsasa	214	
AD-58643.1	A-119326.1	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	164	A-119327.1	usAfsuUfaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcUfususu	215	
AD-58650.1	A-119326.2	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	165	A-119338.1	usAfsuUfsaUfsaAfsaAfsauaUfscUfsuGfscUfscsusu	216	
AD-58646.1	A-119332.1	CfsasGfaUfcAfaAfCfAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	166	A-119333.1	asCfsuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgscsa	217	
AD-58653.1	A-119332.2	CfsasGfaUfcAfaAfCfAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	167	A-119341.1	asCfsuGfsaAfsaUfsuUfsgUfscsasa	218	

⁴ Название видов олигонуклеотида и положение в нуклеотидной последовательности GenBank записи, на которую нацелена антисмысловая цепь, соответствующая ему, показаны в табл. 3.

Таблица 5

Последовательности немодифицированной смысловой и антисмысловой цепи dsRNA C5

ID дуплекса	Смысловая цепь	Смысловая немодифицированная последовательность	SEQ ID NO:	Анти-смысловая	Антисмысловая немодифицированная последовательность	SEQ ID NO:	Виды_название олигонуклеотида
AD-58143.1 UM	A-118423.1	CACUAUAUUUACUUGAUUUU	219	A-118424.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	302	NM_001735.2_1522-1540_as
AD-58149.1 UM	A-118425.1	UAACUCACUAUA AUUACUU	220	A-118426.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	303	NM_001735.2_1517-1535_as
AD-58155.1 UM	A-118427.1	ACAAAUAACUC ACUAUAA	221	A-118428.1	UUUAGUGAGUUUUUUUGU	304	NM_001735.2_1511-1529_as

AD- 58161.1 UM	A- 118429.1	UCCUCUGGAAAU UGGCCUU	222	A- 118430.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	305	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58167.1 UM	A- 118431.1	CAAAUAACUCA CUAUAUU	223	A- 118432.1	AUUUAUAGUGAGUUUUUUG	306	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58173.1 UM	A- 118433.1	CUCUGGAAAUUG GCCUUCA	224	A- 118434.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	307	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58179.1 UM	A- 118435.1	GCAAGAUUUUU UAUAUAU	225	A- 118436.1	UAUUUAUUUUUAUCUUGC	308	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58185.1 UM	A- 118437.1	AAUGUUUUUGUC AAGUACA	226	A- 118438.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	309	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58144.1 UM	A- 118439.1	UUAAACAACAAG UACCUUU	227	A- 118440.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	310	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58150.1 UM	A- 118441.1	UCAGAAAGUCUG UGAAGGA	228	A- 118442.1	UCCUUCACAGACUUCUGA	311	NM_001735.2_4578- 4596_as
AD- 58156.1 UM	A- 118443.1	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	229	A- 118444.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	312	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58162.1 UM	A- 118445.1	AGUUCUGUGUU AAAUGUC	230	A- 118446.1	GACAUUUUAACACAGAACU	313	NM_001735.2_2591- 2609_as
AD- 58168.1 UM	A- 118447.1	GAUUUUGAGUGU AAAAGGA	231	A- 118448.1	UCCUUUUACACUAAAAUC	314	NM_001735.2_2955- 2973_as
AD- 58174.1 UM	A- 118449.1	UGAUGAACCUUG UAAAGAA	232	A- 118450.1	UUCUUUACAAGGUUCAUCA	315	NM_001735.2_2025- 2043_as
AD- 58180.1 UM	A- 118451.1	CAUUGGAACAUU UUUCAUU	233	A- 118452.1	AAUGAAAAAUGUCCAAUG	316	NM_001735.2_3118- 3136_as
AD- 58186.1 UM	A- 118453.1	CCAGAAAUUCGG AGUUAUU	234	A- 118454.1	AAUAACUCCGAAUUUCUGG	317	NM_001735.2_2317- 2335_as
AD- 58145.1 UM	A- 118455.1	CCUGGGAGAUAAA ACUCAC	235	A- 118456.1	GUGAGUUUUUUCUCCAGG	318	NM_001735.2_3618- 3636_as

AD- 58151.1 UM	A- 118457.1	AAAUGAUGAACCC UUGUAAA	236	A- 118458.1	UUUACAAGGUUCAUCAUUU	319	NM_001735.2_2022- 2040_as
AD- 58157.1 UM	A- 118459.1	UGCUCAAGUCACA UUUGAU	237	A- 118460.1	AUCAAAAUGUGACUUGAGCA	320	NM_001735.2_918- 936_as
AD- 58163.1 UM	A- 118461.1	GAUUGCAUAUGCU UAUAAA	238	A- 118462.1	UUUAUAAGCAUAUGCAAUC	321	NM_001735.2_4698- 4716_as
AD- 58169.1 UM	A- 118463.1	UAUCCUGAUAAAA AAUUUA	239	A- 118464.1	UAAUUUUUUUAUCAGGAUA	322	NM_001735.2_205- 223_as
AD- 58175.1 UM	A- 118465.1	GAAGUUUGCAGCU UUUAUU	240	A- 118466.1	AAUAAAAGCUGCAAACUUC	323	NM_001735.2_4147- 4165_as
AD- 58181.1 UM	A- 118467.1	AGAAAUUGAUCAU AUUGGA	241	A- 118468.1	UCCAAUAUGAUCAAUUUCU	324	NM_001735.2_555- 573_as
AD- 58187.1 UM	A- 118469.1	CCUGAUAAAAAU UUAGUU	242	A- 118470.1	AACUAAAUUUUUAUCAGG	325	NM_001735.2_208- 226_as
AD- 58146.1 UM	A- 118471.1	GAAAAGAAUCUU AGUAAA	243	A- 118472.1	UUUACUAAGAUUUUUUC	326	NM_001735.2_2786- 2804_as
AD- 58152.1 UM	A- 118473.1	UUUCAAAAGUUA AACAUU	244	A- 118474.1	AAUGUUUAUACUUUGAUAA	327	NM_001735.2_1596- 1614_as
AD- 58158.1 UM	A- 118475.1	CCUACAAACUGAA UUUGGU	245	A- 118476.1	ACCAAAUUCAGUUUGUAGG	328	NM_001735.2_1082- 1100_as
AD- 58164.1 UM	A- 118477.1	GGAGCAAACAUU GUCAUU	246	A- 118478.1	AAUGACAUUGUUUGCUCC	329	NM_001735.2_87- 105_as
AD- 58170.1 UM	A- 118479.1	AUGUAACACUGU AGUUCA	247	A- 118480.1	UGAACUACAGUUGUUACAU	330	NM_001735.2_4109- 4127_as
AD- 58176.1 UM	A- 118481.1	GGAAAUCAUUGGA ACAUUU	248	A- 118482.1	AAAUGUCCAAUGAUUUCC	331	NM_001735.2_3112- 3130_as
AD- 58182.1 UM	A- 118483.1	UAAGAAUUUGAA AUUACU	249	A- 118484.1	AGUAAUUUCAAAAUCUUA	332	NM_001735.2_759- 777_as

AD- 58188.1 UM	A- 118485.1	UUCUGCAACUGAA UUCGAU	250	A- 118486.1	AUCGAAUUCAGUUGCAGAA	333	NM_001735.2_4412- 4430_as
AD- 58147.1 UM	A- 118487.1	CCUUGGAAAGAGU AUUUCA	251	A- 118488.1	UGAAAUACUCUUCCAAGG	334	NM_001735.2_1886- 1904_as
AD- 58153.1 UM	A- 118489.1	UGAUAAAAAUUU AGUUAC	252	A- 118490.1	GUAACUAAAAUUUUUAUCA	335	NM_001735.2_210- 228_as
AD- 58159.1 UM	A- 118491.1	CUUGGAAAGAGU UUUCA	253	A- 118492.1	UUGAAAUACUCUUCCAAG	336	NM_001735.2_1887- 1905_as
AD- 58190.1 UM	A- 118519.1	CACUAUAUUACU UGAUUU	254	A- 118520.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	337	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58196.1 UM	A- 118521.1	UAACUCACUAUAA UUACUU	255	A- 118522.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	338	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58202.1 UM	A- 118523.1	ACAAAAAACUCA CUAUA	256	A- 118524.1	UUUAUGAGAGUUUUUUGU	339	NM_001735.2_1511- 1529_as
AD- 58208.1 UM	A- 118525.1	UCCUCUGGAAUU GGCCUU	257	A- 118526.1	AAGGCCAAUUCCAGAGGA	340	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58214.1 UM	A- 118527.1	CAAAUAACUCAC UAUAAU	258	A- 118528.1	AUUUAUGAGUUUUUUG	341	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58220.1 UM	A- 118529.1	CUCUGGAAUUGG CCUUCA	259	A- 118530.1	UGAAGGCCAAUUCCAGAG	342	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58226.1 UM	A- 118531.1	GCAAGAUUUUUU AUAAUA	260	A- 118532.1	UAUUUAAAAAUUCUUGC	343	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58231.1 UM	A- 118533.1	AAUGUUUUUGUCA AGUACA	261	A- 118534.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	344	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58191.1 UM	A- 118535.1	UUAACAACAAGU ACCUUU	262	A- 118536.1	AAAGGUACUUGUUGUUUA	345	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58197.1 UM	A- 118537.1	UCAGAAAGUCUGU GAAGGA	263	A- 118538.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	346	NM_001735.2_4578- 4596_as

AD- 58203.1 UM	A- 118539.1	ACUGAAGCAUUUG AUGCAA	264	A- 118540.1	UUGCAUCAAAAUGCUUCAGU	347	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58209.1 UM	A- 118541.1	AGUUCUGUGUUAA AAUGUC	265	A- 118542.1	GACAUUUUAACACAGAACU	348	NM_001735.2_2591- 2609_as
AD- 58233.1 UM	A- 118565.1	CACUAUAUUACU UGAUUU	266	A- 118566.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	349	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58193.1 UM	A- 118567.1	UAACUCACUAUAA UUACUU	267	A- 118568.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	350	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58199.1 UM	A- 118569.1	ACAAAUAACUCA CUAUAA	268	A- 118570.1	UUUAGUGAGUUUUUUUGU	351	NM_001735.2_1511- 1529_as
AD- 58205.1 UM	A- 118571.1	UCCUCUGGAAAUU GGCCUU	269	A- 118572.1	AAGGCCAAUUCCAGAGGA	352	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58211.1 UM	A- 118573.1	CAAAUAACUCAC UAUAAU	270	A- 118574.1	AUUUAGUGAGUUUUUUUG	353	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58217.1 UM	A- 118575.1	CUCUGGAAUUGG CCUUCA	271	A- 118576.1	UGAAGGCCAAUUCCAGAG	354	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58223.1 UM	A- 118577.1	GCAAGAUUUUUU AUAAUA	272	A- 118578.1	UAUUUAAAAAUUCUUGC	355	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58229.1 UM	A- 118579.1	AAUGUUUUUGUC AGUACA	273	A- 118580.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	356	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58234.1 UM	A- 118581.1	UUAAACAACAAGU ACCUUU	274	A- 118582.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	357	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58194.1 UM	A- 118583.1	UCAGAAAGUCUGU GAAGGA	275	A- 118584.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	358	NM_001735.2_4578- 4596_as
AD- 58200.1 UM	A- 118585.1	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	276	A- 118586.1	UUGCAUCAAAAUGCUUCAGU	359	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58206.1 UM	A- 118587.1	AGUUCUGUGUUAA AAUGUC	277	A- 118588.1	GACAUUUUAACACAGAACU	360	NM_001735.2_2591- 2609_as

AD- 58236.1 UM	A- 118423.2	CACUAUAAUACU UGAUUU	278	A- 118644.1	AAAUCAAGUAAUUAUAGUG	361	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58242.1 UM	A- 118425.2	UAACUCACUAUA AUUACUU	279	A- 118645.1	AAGUAAUUAUAGUGAGUUA	362	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58248.1 UM	A- 118427.2	ACAAAUAACUC ACUAUAA	280	A- 118646.1	UUUAUAGUGAUUUUUUGU	363	NM_001735.2_1511- 1529_as
AD- 58254.1 UM	A- 118429.2	UCCUCUGGAAU UGGCCUU	281	A- 118647.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	364	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58260.1 UM	A- 118431.2	CAAAUAACUCA CUAUAAU	282	A- 118648.1	AUUUAUAGUGAUUUUUUG	365	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58266.1 UM	A- 118433.2	CUCUGGAAUUG GCCUUCA	283	A- 118649.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	366	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58272.1 UM	A- 118435.2	GCAAGAUUUUU UAUAAUA	284	A- 118650.1	UAUUUAAAAAUUCUUGC	367	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58277.1 UM	A- 118437.2	AAUGUUUUUGUC AAGUACA	285	A- 118651.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	368	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58237.1 UM	A- 118439.2	UUAAACAACAAG UACCUUU	286	A- 118652.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	369	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58243.1 UM	A- 118441.2	UCAGAAAGUCUG UGAAGGA	287	A- 118653.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	370	NM_001735.2_4578- 4596_as
AD- 58249.1 UM	A- 118443.2	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	288	A- 118654.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	371	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58255.1 UM	A- 118445.2	AGUUCUGUGUU AAAAUGUC	289	A- 118655.1	GACAUUUUAACACAGAACU	372	NM_001735.2_2591- 2609_as
AD- 58279.1 UM	A- 118423.3	CACUAUAAUUA CUUGAUUU	290	A- 118667.1	AAAUCAAGUAAUUAUAGUG	373	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58239.1 UM	A- 118425.3	UAACUCACUAUA AUUACUU	291	A- 118668.1	AAGUAAUUAUAGUGAGUUA	374	NM_001735.2_1517- 1535_as

AD-58245.1 UM	A-118427.3	ACAAAAUACUC ACUAUAA	292	A-118669.1	UUUAUGAGAGUUUUUUGU	375	NM_001735.2_1511-1529_as
AD-58251.1 UM	A-118429.3	UCCUCUGGAAAUU GGCCUU	293	A-118670.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	376	NM_001735.2_2733-2751_as
AD-58257.1 UM	A-118431.3	CAAAUAACUCAC UAUAU	294	A-118671.1	AUUUAUGAGAGUUUUUUG	377	NM_001735.2_1512-1530_as
AD-58263.1 UM	A-118433.3	CUCUGGAAAUUG GCCUUA	295	A-118672.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	378	NM_001735.2_2735-2753_as
AD-58269.1 UM	A-118435.3	GCAAGAUUUUU UAUAUA	296	A-118673.1	UAUUUAAAAAUUCUUGC	379	NM_001735.2_784-802_as
AD-58275.1 UM	A-118437.3	AAUGUUUUUGUC AAGUACA	297	A-118674.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	380	NM_001735.2_4744-4762_as
AD-58280.1 UM	A-118439.3	UUAAACAACAAGU ACCUUU	298	A-118675.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	381	NM_001735.2_982-1000_as
AD-58240.1 UM	A-118441.3	UCAGAAAGUCUGU GAAGGA	299	A-118676.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	382	NM_001735.2_4578-4596_as
AD-58246.1 UM	A-118443.3	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	300	A-118677.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	383	NM_001735.2_169-187_as
AD-58252.1 UM	A-118445.3	AGUUCUGUGUUA AAAUGUC	301	A-118678.1	GACAUUUUAAACACAGAACU	384	NM_001735.2_2591-2609_as

Таблица 6

Последовательности модифицированной смысловой и антисмысловой цепи dsRNA C5

ID дуп-лекса	Смысловая цепь	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Анти-смысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Виды_название олиго Нуклеотида ⁵
AD-58143.1	A-118423.1	cAcuAuAAuuAcuu GAuuudTsdT	385	A-118424.1	AAAUCaAGuAAUuAuA GUGdTsdT	468	
AD-58149.1	A-118425.1	uAAcucAcuAuAAuu AcuudTsdT	386	A-118426.1	AACuAAUuAuACUCAG UuAdTsdT	469	
AD-58155.1	A-118427.1	AcAAAAuAAcucAcu AuAAdTsdT	387	A-118428.1	UuAuAGUGAGUuAUUU UGUdTsdT	470	

AD-58161.1	A-118429.1	uccucuGGAAuGGccuudTsdT	388	A-118430.1	AAGGCcAAUUUcAGAGGAdTsdT	471	
AD-58167.1	A-118431.1	CAAAuAAcucAcuAuAAudTsdT	389	A-118432.1	AUuAuAGUGAGUuAUUUGdTsdT	472	
AD-58173.1	A-118433.1	cucuGGAAuGGccuucAdTsdT	390	A-118434.1	UGAAGGCcAAUUUcCAGA GdTsdT	473	
AD-58179.1	A-118435.1	GcAAGAuAuuuuuAuAAuAdTsdT	391	A-118436.1	uAUuAuAAAAuAUCUUGCdTsdT	474	
AD-58185.1	A-118437.1	AAuGuuuuuGucAAGuAcAdTsdT	392	A-118438.1	UGuACUUGAcAAAAcAUUdTsdT	475	
AD-58144.1	A-118439.1	uuAAAcAAcAAGuAccuudTsdT	393	A-118440.1	AAAGGuACUUGUUGUuAdTsdT	476	
AD-58150.1	A-118441.1	ucAGAAAGucuGuGAAGGAdTsdT	394	A-118442.1	UCCUUcAcAGACUUUCUGAdTsdT	477	
AD-58156.1	A-118443.1	AcuGAAGcAuuuGAuGcAAAdTsdT	395	A-118444.1	UUGcAUcAAAUGCUUcAGUdTsdT	478	
AD-58162.1	A-118445.1	AGuucuGuGuuAAAAuGucdTsdT	396	A-118446.1	GACAUUuAAcAcAGAAcUdTsdT	479	
AD-58168.1	A-118447.1	GAuuuuGAGuGuAAAAGGAdTsdT	397	A-118448.1	UCCUUuAcACUcAAAAUCdTsdT	480	
AD-58174.1	A-118449.1	uGAuGAAccuuGuAAAGAAAdTsdT	398	A-118450.1	UUCUUuAcAAGGUcAUcAdTsdT	481	
AD-58180.1	A-118451.1	cAuuGGAAcAuuuuucAUudTsdT	399	A-118452.1	AAUGAAAAUGUUCcAAUGdTsdT	482	
AD-58186.1	A-118453.1	ccAGAAuucGGAGuuAUudTsdT	400	A-118454.1	AAuAACUCCGAAUUUCUGGdTsdT	483	
AD-58145.1	A-118455.1	ccuGGGAGuAAAAcucAcdTsdT	401	A-118456.1	GUGAGUUuAUCUCCcAGGdTsdT	484	
AD-58151.1	A-118457.1	AAAuGAuGAAccuuGuAAAdTsdT	402	A-118458.1	UUuAcAAGGUcAUcAUUdTsdT	485	
AD-58157.1	A-118459.1	uGcucAAGucAcAuuuGAudTsdT	403	A-118460.1	AUCAAAUGUGACUUGAGcAdTsdT	486	
AD-58163.1	A-118461.1	GAuuGcAuAuGcuuAuAAAdTsdT	404	A-118462.1	UUuAuAAGcAuAUGcAAUCdTsdT	487	
AD-58169.1	A-118463.1	uAuccuGAuAAAAAuuAdTsdT	405	A-118464.1	uAAAAUUUUuAUCAGGAuAdTsdT	488	
AD-58175.1	A-118465.1	GAAGuuuGcAGcuuuuAuudTsdT	406	A-118466.1	AAuAAAAGCUGcAAACUUCdTsdT	489	
AD-58181.1	A-118467.1	AGAAuuGAucAuAuuGGAdTsdT	407	A-118468.1	UCCAAuAUGAUcAAUUUCUdTsdT	490	
AD-58187.1	A-118469.1	ccuGAuAAAAAuuuAGuudTsdT	408	A-118470.1	AACuAAAAUUUUuAUCAGGdTsdT	491	
AD-58146.1	A-118471.1	GAAAAGAAucuuAGuAAAdTsdT	409	A-118472.1	UUuACuAAGAUUUCUUCdTsdT	492	

AD-58152.1	A-118473.1	uuAucAAAGuAuAAAcA uudTsdT	410	A-118474.1	AAUGUuAuACUUGAu AAdTsdT	493	
AD-58158.1	A-118475.1	ccuAcAAAcuGAAuuuGG udTsdT	411	A-118476.1	ACcAAAUUcAGUUUGuA GGdTsdT	494	
AD-58164.1	A-118477.1	GGAGcAAAcAuAuGucAu udTsdT	412	A-118478.1	AAUGAcAuAUGUUUGCU CCdTsdT	495	
AD-58170.1	A-118479.1	AuGuAAcAAcuGuAGuuc AdTsdT	413	A-118480.1	UGAACuAcAGUUGUuAc AUdTsdT	496	
AD-58176.1	A-118481.1	GGAAAUcAuuGGAACuu udTsdT	414	A-118482.1	AAAUGUUCcAAUGAUUU CCdTsdT	497	
AD-58182.1	A-118483.1	uAAGAAuuuuGAAuuAc udTsdT	415	A-118484.1	AGuAAUUUcAAAAUUC UuAdTsdT	498	
AD-58188.1	A-118485.1	uucuGcAAcuGAAuucGA udTsdT	416	A-118486.1	AUCGAAUUCAGUUGcA GAAdTsdT	499	
AD-58147.1	A-118487.1	ccuuGGAAAGAGuAuuuc AdTsdT	417	A-118488.1	UGAAAUcACUCUUUCcAA GGdTsdT	500	
AD-58153.1	A-118489.1	uGAuAAAAAuuuAGuuA cdTsdT	418	A-118490.1	GuAACuAAAAUUUUuAU cAdTsdT	501	
AD-58159.1	A-118491.1	cuuCGAAAGAGuAuuucA AdTsdT	419	A-118492.1	UUGAAAUcACUCUUUCcA AGdTsdT	502	
AD-58190.1	A-118519.1	CACUAUAAUUACUUGAUU UdTdT	420	A-118520.1	AAAUCAAGUAAUUUA GUGdTdT	503	
AD-58196.1	A-118521.1	UAACUCACUAUAAUUAC UUdTdT	421	A-118522.1	AAGUAAUUUAUGUGAGU UAdTdT	504	
AD-58202.1	A-118523.1	ACAAAAUAACUCACUAU AAdTdT	422	A-118524.1	UUUAUGAGAGUUUUUU UdTdT	505	
AD-58208.1	A-118525.1	UCCUCUGAAAUUGGCC UUdTdT	423	A-118526.1	AAGGCCAAUUCCAGAG GAdTdT	506	
AD-58214.1	A-118527.1	CAAAUAACUCACUAUA AUdTdT	424	A-118528.1	AUUUAUGAGUUAUU UUGdTdT	507	
AD-58220.1	A-118529.1	CUCUGGAAAUUGCCUU CAdTdT	425	A-118530.1	UGAAGGCCAAUUCCAG AGdTdT	508	
AD-58226.1	A-118531.1	GCAAGAUUUUUUAUA AUAdTdT	426	A-118532.1	UAUUUAUUUUUAUCUU GCdTdT	509	
AD-58231.1	A-118533.1	AAUGUUUUUGUCAAGUA CAdTdT	427	A-118534.1	UGUACUUGACAAAAACA UUdTdT	510	
AD-58191.1	A-118535.1	UUAAACAACAAGUACCU UUdTdT	428	A-118536.1	AAAGGUACUUGUUGUUU AAdTdT	511	
AD-58197.1	A-118537.1	UCAGAAAGUCUGUGAAG GAdTdT	429	A-118538.1	UCCUUCACAGACUUUCU GAdTdT	512	
AD-58203.1	A-118539.1	ACUGAAGCAUUUGAUGC AAdTdT	430	A-118540.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAG UdTdT	513	
AD-58209.1	A-118541.1	AGUUCUGUGUUAAAUG UCdTdT	431	A-118542.1	GACAUUUUAACACAGAA CUdTdT	514	

AD-58249.1	A-118443.2	AcuGAAGcAuuuGAuGc AAdTsdT	454	A-118654.1	uuGcAUcAAAuGCuUcAGU dTsdT	537	
AD-58255.1	A-118445.2	AGuucuGuGuuAAAAuG ucdTsdT	455	A-118655.1	GAcAuUUuAAcAcAGAACU dTsdT	538	
AD-58279.1	A-118423.3	cAcuAuAAuuAcuuGAu uudTsdT	456	A-118667.1	AAAUCAAGuAAuuAuAgug dTsdT	539	
AD-58239.1	A-118425.3	uAACucAcuAuAAuuAc uudTsdT	457	A-118668.1	AAGuAAuUuAGuGAGuua dTsdT	540	
AD-58245.1	A-118427.3	AcAAAAuAAcucAcuAu AAdTsdT	458	A-118669.1	UuAuAGuGAGuuAuuuugu dTsdT	541	
AD-58251.1	A-118429.3	uccucuGGAAAuuGGcc uudTsdT	459	A-118670.1	AAGGCCAAuUuCCAGagg dTsdT	542	
AD-58257.1	A-118431.3	CAAAuAAcucAcuAuA AudTsdT	460	A-118671.1	AuUAuAGuGAGuuAuuuug dTsdT	543	
AD-58263.1	A-118433.3	cucuGGAAuuGGccuu cAdTsdT	461	A-118672.1	UGAAGGCCAAuuuCCAgag dTsdT	544	
AD-58269.1	A-118435.3	GcAAGAuAuuuuuAuAA uAdTsdT	462	A-118673.1	UAuUAuAAAAuAuCuugcd TsdT	545	
AD-58275.1	A-118437.3	AAuGuuuuuGucAAGuA cAdTsdT	463	A-118674.1	UGuACuUGACAAAAACauu dTsdT	546	
AD-58280.1	A-118439.3	uuAAAcAAcAGuAccu uudTsdT	464	A-118675.1	AAAGGuACuUGuuGuuuua dTsdT	547	
AD-58240.1	A-118441.3	ucAGAAAGucuGuGAAG GAdTsdT	465	A-118676.1	UCCuUCACAGACuuuCuga dTsdT	548	
AD-58246.1	A-118443.3	AcuGAAGcAuuuGAuGc AAdTsdT	466	A-118677.1	UuGCAUCAAAuGCuuCagu dTsdT	549	
AD-58252.1	A-118445.3	AGuucuGuGuuAAAAuG ucdTsdT	467	A-118678.1	GACAUuUAACACAGAacud TsdT	550	

⁵ Название видов олигонуклеотида и положение в нуклеотидной последовательности GenBank записи, на которую нацелена антисмысловая цепь, соответствующая ему, показаны в табл. 5.

Таблица 7

Тест разовой дозы С5 в клетках Нер3В с GalNAC-конъюгированными иРНК

ID дуплекса	10 нМ AVG	0,1 нМ AVG	10 нМ STDEV	0,1 нМ STDEV
AD-58093.1	15,62	21,60	7,48	6,52
AD-58099.1	9,07	14,70	1,18	4,65
AD-58105.1	36,71	60,23	5,07	19,83
AD-58111.1	11,83	22,78	3,51	12,75
AD-58117.1	12,43	33,46	2,00	23,56
AD-58123.1	8,05	15,18	2,89	7,94
AD-58129.1	10,77	40,06	1,30	19,66
AD-58088.1	6,55	16,40	1,24	4,58
AD-58094.1	19,59	40,68	7,64	12,30
AD-58100.1	10,92	20,12	0,74	8,38
AD-58106.1	10,97	37,23	2,49	19,95
AD-58112.1	13,24	29,32	2,90	14,08
AD-58118.1	6,63	15,23	0,54	5,72
AD-58124.1	7,17	13,00	1,44	6,48
AD-58130.1	10,38	17,92	2,36	6,92
AD-58089.1	8,81	30,67	2,91	10,53
AD-58095.1	8,72	14,66	1,04	3,37
AD-58101.1	8,17	19,36	1,30	5,69
AD-58107.1	4,84	18,10	1,66	7,21
AD-58113.1	8,78	14,62	1,77	7,89
AD-58119.1	8,90	15,01	0,91	7,35
AD-58125.1	11,13	17,04	2,61	9,03
AD-58131.1	13,50	40,14	1,08	12,07
AD-58090.1	7,90	21,57	2,95	6,61
AD-58096.1	8,02	16,56	1,54	6,68
AD-58102.1	12,40	27,93	1,83	11,78
AD-58108.1	12,02	15,07	2,88	5,74
AD-58114.1	11,86	25,05	1,48	9,46
AD-58120.1	7,65	10,57	0,58	3,56
AD-58126.1	8,45	15,39	2,08	7,42
AD-58132.1	8,50	19,26	2,52	9,38
AD-58091.1	8,68	18,05	2,95	6,62
AD-58097.1	9,31	23,02	0,67	10,10
AD-58103.1	8,53	17,23	2,90	7,27
AD-1955	57,41	81,16	10,76	5,29
Имитация	78,61	75,97	5,70	2,76
Необработанные	100	100	6,13	5,98

Таблица 8

Тест трансфекции разовой дозы C5 в первичных гепатоцитах мыши с GalNAC-конъюгированными иРНК

ID дуплекса	10 нМ AVG	0,1 нМ AVG	10 нМ STDEV	0,1 нМ STDEV
AD-58093.1	1,53	1,65	0,17	0,25
AD-58099.1	1,65	1,50	0,61	0,22
AD-58105.1	11,20	46,95	0,08	3,89
AD-58111.1	2,49	2,13	0,26	0,20
AD-58117.1	3,57	31,91	0,93	0,62
AD-58123.1	4,29	2,97	0,11	2,22
AD-58129.1	1,19	8,53	0,23	0,72
AD-58088.1	0,84	1,34	0,68	0,07
AD-58094.1	11,34	66,82	0,17	3,01
AD-58100.1	2,78	1,51	0,43	0,33
AD-58106.1	6,79	52,91	4,42	6,78
AD-58121.1	1,94	2,15	0,04	0,91
AD-58133.1	1,74	3,25	0,19	1,64
AD-58116.1	1,76	2,21	1,27	0,78
AD-1955	87,39	91,71	5,77	4,68
Имитация	79,67	89,02	1,51	3,91
Необработанные	100	100	6,39	13,11

Таблица 9

Тест разовой дозы C5 в первичных гепатоцитах яванского макака с GalNAC-конъюгированными иРНК

ID дуплекса	500 нМ AVG	5 нМ AVG	500 нМ STDEV	5 нМ STDEV
AD-58093.1	63,94	83,09	2,14	12,65
AD-58099.1	61,34	85,85	12,32	21,95
AD-58105.1	91,98	97,57	6,09	11,48
AD-58111.1	71,27	92,28	1,93	12,72
AD-58117.1	73,42	88,82	3,24	11,08
AD-58123.1	75,14	73,06	7,72	9,71
AD-58129.1	81,66	90,62	2,13	4,77
AD-58088.1	53,63	87,03	5,93	19,86
AD-58094.1	89,62	93,65	0,87	14,76
AD-58100.1	79,56	96,70	4,31	1,10
AD-58106.1	116,24	125,99	14,28	40,65
AD-58112.1	97,19	107,81	N/A	3,13
AD-58118.1	67,40	97,38	5,28	22,64
AD-58124.1	58,04	96,14	8,72	10,64
AD-58130.1	84,19	88,65	10,50	4,34
AD-58089.1	83,83	83,44	1,91	12,26
AD-58095.1	58,53	78,02	15,07	12,45
AD-58101.1	76,68	76,73	3,95	6,35
AD-58107.1	57,37	86,78	14,71	2,99
AD-58113.1	37,79	71,10	8,27	7,76
AD-58119.1	36,77	83,16	3,42	9,66
AD-58125.1	72,40	96,53	4,46	4,96
AD-58131.1	95,58	101,69	10,17	2,21
AD-58090.1	56,37	75,00	3,21	4,97
AD-58096.1	44,33	57,99	11,46	25,17
AD-58102.1	95,46	89,35	0,83	1,76

AD-58108.1	41,54	56,41	8,41	0,14
AD-58114.1	88,32	101,88	20,02	30,29
AD-58120.1	37,34	56,41	0,73	2,14
AD-58126.1	84,97	105,90	2,39	7,96
AD-58132.1	81,55	85,12	12,93	8,94
AD-58091.1	78,88	84,60	44,66	17,40
AD-58097.1	106,06	98,16	13,74	3,14
AD-58103.1	57,21	89,46	6,40	5,93
Необработанные	100	100	8,77	10,33

Таблица 10

Тест свободного поглощения разовой дозы C5 в первичных гепатоцитах мыши с GalNAC-конъюгированными иРНК

ID дуплекса	500 нМ AVG	5 нМ AVG	500 нМ STDEV	5 нМ STDEV
AD-58093.1	31,62	64,91	7,13	8,39
AD-58099.1	9,46	29,63	1,29	5,66
AD-58105.1	84,77	96,41	5,22	1,89
AD-58111.1	17,35	50,95	1,21	3,16
AD-58117.1	94,95	139,52	15,43	43,39
AD-58123.1	13,07	44,58	2,11	3,49
AD-58129.1	68,87	85,04	2,62	4,42
AD-58088.1	17,61	48,22	2,22	3,40
AD-58094.1	95,92	104,23	4,16	6,53
AD-58100.1	34,92	61,71	1,30	2,15
AD-58106.1	85,26	107,53	2,30	3,38
AD-58121.1	12,88	43,76	1,41	1,28
AD-58133.1	20,97	42,76	0,24	0,11
AD-58116.1	8,35	38,04	1,35	1,40
Необработанные	100,00	100,00	3,85	4,38

Таблица 11

Значения IC₅₀ в первичных гепатоцитах яванского макака с GalNAC-конъюгированными иРНК

ID дуплекса	IC ₅₀ (нМ)	STDEV
AD-58099.1	3,131	1,141
AD-58111.1	12,750	5,280
AD-58123.1	0,679	7,587
AD-58088.1	0,218	3,487
AD-58113.1	7,296	3,540
AD-58119.1	33,240	14,740
AD-58096.1	10,380	4,199
AD-58108.1	0,953	10,080
AD-58120.1	36,170	88,070

Таблица 12
Значения IC₅₀ в первичных гепатоцитах мыши
с GalNAC-конъюгированными иРНК

ID дуплекса	IC ₅₀ (нМ)	STDEV
AD-58099	3,777	0,122
AD-58111	0,622	2,421
AD-58123	0,549	1,626
AD-58088	9,513	2,588
AD-58121	2,169	1,176
AD-58133	3,802	1,006
AD-58116	2,227	0,604
AD-58644.1	4,596	0,3506
AD-58651.1	59,76	51,99
AD-58641.1	0,82	0,2618
AD-58648.1	7,031	1,256
AD-58642.1	0,5414	0,7334
AD-58649.1	3,32	4,922
AD-58647.1	1,356	0,5215
AD-58654.1	2,09	0,8338
AD-58645.1	2,944	0,3315
AD-58652.1	5,316	2,477
AD-58643.1	2,179	1,112
AD-58650.1	8,223	3,76
AD-58646.1	2,581	0,8186
AD-58653.1	2,451	1,249

Таблица 13

Тест разовой дозы C5 в клетках Hep3В с
модифицированными и немодифицированными иРНК

Дуплекс	1 нМ AVG	0,01 нМ AVG	1 нМ STDEV	0,01 нМ STDEV
AD-58143.1	12,13	100,58	3,47	3,94
AD-58149.1	10,46	64,97	0,98	0,00
AD-58155.1	44,88	76,24	1,56	3,74
AD-58161.1	8,51	102,30	1,06	0,50
AD-58167.1	6,54	76,24	1,15	3,74
AD-58173.1	6,85	107,44	0,85	4,74
AD-58179.1	10,19	78,07	0,59	1,15
AD-58185.1	29,46	79,99	3,64	0,78
AD-58144.1	16,82	81,95	1,09	0,40
AD-58150.1	11,05	76,20	2,55	0,00
AD-58156.1	25,92	76,73	2,72	1,50
AD-58162.1	13,25	71,89	0,43	3,87
AD-58168.1	9,74	45,16	0,52	1,11
AD-58174.1	4,84	70,14	0,25	2,75
AD-58180.1	9,41	56,77	1,91	1,95
AD-58186.1	9,97	68,91	1,03	0,34
AD-58145.1	14,29	103,38	1,94	2,03
AD-58151.1	10,16	81,17	1,71	4,77
AD-58157.1	4,72	63,19	1,05	0,00

044245

AD-58163.1	4,95	40,13	1,65	0,59
AD-58169.1	17,02	83,10	1,88	2,04
AD-58175.1	8,30	62,54	0,28	0,31
AD-58181.1	21,89	55,26	4,22	3,52
AD-58187.1	61,96	71,12	2,61	2,79
AD-58146.1	14,25	95,23	2,64	6,53
AD-58152.1	11,22	70,09	0,80	7,88
AD-58158.1	7,96	98,86	0,76	4,36
AD-58164.1	11,60	43,83	2,06	3,43
AD-58170.1	12,28	39,59	0,96	1,36
AD-58176.1	6,89	38,77	1,04	1,33
AD-58182.1	18,65	55,78	0,96	0,55
AD-58188.1	5,40	69,39	1,07	0,34
AD-58147.1	8,22	106,66	0,77	2,61
AD-58153.1	68,10	104,17	4,44	18,29
AD-58159.1	8,76	81,41	1,54	2,79
AD-58190.1	21,94	77,26	2,23	0,76
AD-58196.1	15,97	72,43	1,07	5,32
AD-58202.1	11,99	93,83	5,34	2,76
AD-58208.1	18,63	52,07	12,88	2,55
AD-58214.1	6,85	94,15	0,51	2,31
AD-58220.1	11,50	78,34	3,85	0,77
AD-58226.1	5,77	57,75	1,71	1,13
AD-58231.1	7,23	75,67	1,07	0,74
AD-58191.1	35,40	66,17	5,50	4,21
AD-58197.1	12,05	67,49	1,70	0,33
AD-58203.1	15,16	66,80	1,46	1,31
AD-58209.1	7,58	71,23	3,58	6,28
AD-58233.1	27,01	86,02	0,86	0,42
AD-58193.1	15,37	99,85	1,44	0,00
AD-58199.1	21,52	78,39	6,02	16,40
AD-58205.1	24,13	78,88	5,46	0,77

044245

AD-58211.1	16,38	32,37	2,61	0,48
AD-58217.1	12,23	70,16	0,29	3,44
AD-58223.1	8,51	72,85	3,01	1,79
AD-58229.1	5,50	75,93	1,96	0,37
AD-58234.1	46,86	101,94	15,59	0,00
AD-58194.1	14,49	107,05	2,47	4,20
AD-58200.1	16,21	61,04	0,96	1,20
AD-58206.1	13,25	37,73	2,82	2,03
AD-58236.1	8,29	119,17	1,16	2,92
AD-58242.1	12,05	102,69	0,44	4,03
AD-58248.1	62,78	83,41	15,22	3,27
AD-58254.1	11,18	100,54	1,59	0,00
AD-58260.1	8,42	71,84	1,10	0,35
AD-58266.1	14,05	92,21	1,91	2,26
AD-58272.1	22,63	81,11	1,62	1,59
AD-58277.1	70,51	75,67	4,80	0,74
AD-58237.1	28,10	98,56	1,96	5,79
AD-58243.1	14,16	86,05	1,11	2,95
AD-58249.1	77,08	96,45	15,14	0,95
AD-58255.1	12,27	47,89	2,58	0,00
AD-58279.1	25,78	94,13	5,52	0,46
AD-58239.1	22,98	83,45	0,28	4,91
AD-58245.1	89,60	90,93	15,24	0,45
AD-58251.1	28,39	86,32	7,29	0,00
AD-58257.1	48,97	64,53	9,10	1,90
AD-58263.1	9,14	83,39	1,27	1,63
AD-58269.1	83,84	75,94	15,90	1,12
AD-58275.1	10,29	86,32	0,73	0,85
AD-58280.1	72,77	110,04	7,44	3,24
AD-58240.1	65,42	75,69	3,82	2,23
AD-58246.1	59,19	65,88	28,95	0,65
AD-58252.1	15,35	97,26	1,14	7,62
Имитация	76,53	66,57	14,26	4,72
AD-1955	72,30	82,72	19,54	49,99
Необработанные	100,00	100,00	21,68	26,78

Таблица 14

Тест разовой дозы C5 в первичных гепатоцитах мыши
с модифицированными и немодифицированными иРНК

ID дуплекса	1 нМ AVG	0,1 нМ AVG	1 нМ STDEV	0,1 нМ STDEV
AD-58143.1	4,51	81,77	3,13	8,75
AD-58149.1	4,65	73,16	3,14	20,17
AD-58155.1	65,56	79,74	4,66	9,36
AD-58161.1	16,82	81,11	6,22	7,43
AD-58167.1	4,72	77,12	1,17	14,25
AD-58173.1	5,57	76,00	3,14	13,52
AD-58179.1	14,55	77,88	1,44	18,40
AD-58185.1	15,69	72,59	8,67	7,81
AD-58144.1	8,70	91,49	0,90	7,08
AD-58150.1	12,51	84,01	1,64	8,20
AD-58156.1	18,23	97,32	1,47	19,50
AD-58162.1	7,72	78,89	5,19	13,80
AD-58190.1	11,86	92,80	2,82	4,41
AD-58196.1	7,27	82,71	1,39	31,81
AD-58202.1	10,67	87,11	1,04	35,79
AD-58208.1	32,21	74,39	8,60	27,45
AD-58214.1	4,24	67,63	0,45	17,85
AD-58220.1	13,64	96,14	4,56	14,36
AD-58226.1	3,83	63,44	1,30	11,94
AD-58231.1	5,95	82,24	2,80	17,36
AD-58191.1	14,50	99,50	5,48	5,53
AD-58197.1	16,12	93,09	0,81	3,21
AD-58203.1	12,52	104,63	5,98	6,02

044245

AD-58209.1	8,79	59,35	3,05	13,07
AD-58233.1	9,50	64,26	5,69	8,70
AD-58193.1	8,88	89,60	3,36	3,08
AD-58199.1	13,56	87,14	2,18	6,44
AD-58205.1	46,84	89,13	4,48	17,16
AD-58211.1	13,10	111,62	1,10	21,54
AD-58217.1	29,79	117,49	11,85	20,41
AD-58223.1	20,53	105,44	1,94	2,98
AD-58229.1	13,76	98,15	1,05	9,03
AD-58234.1	12,33	71,34	0,72	4,17
AD-58194.1	14,02	90,60	1,39	15,64
AD-58200.1	5,25	90,95	1,37	31,70
AD-58206.1	8,19	109,47	3,99	21,75
AD-58236.1	2,07	70,19	0,80	20,59
AD-58242.1	4,76	53,26	1,59	11,56
AD-58248.1	62,42	78,23	5,47	25,85
AD-58254.1	16,47	70,22	2,92	21,74
AD-58260.1	2,84	75,65	0,38	11,59
AD-58266.1	40,70	89,88	16,05	11,57
AD-58272.1	21,42	59,44	13,29	10,98
AD-58277.1	71,72	121,44	16,35	21,16
AD-58237.1	11,85	112,68	9,22	12,88
AD-58243.1	10,46	90,64	3,42	4,33
AD-58249.1	71,47	113,30	4,30	3,84
AD-58255.1	6,86	78,55	2,22	28,37
AD-58279.1	7,15	74,96	2,84	4,72
AD-58239.1	13,64	106,45	1,87	8,25
AD-58245.1	68,67	112,08	21,89	7,73
AD-58251.1	47,01	133,20	4,69	7,14
AD-58257.1	30,68	87,51	2,87	32,84
AD-58263.1	7,22	83,23	2,55	37,50
AD-58269.1	78,90	106,06	5,07	3,04
AD-58275.1	8,92	95,77	1,91	7,14
AD-58280.1	16,67	78,47	4,15	6,06
AD-58240.1	71,03	138,54	5,32	10,87
AD-58246.1	71,87	89,02	4,95	8,63
AD-58252.1	4,04	56,10	1,23	12,02
Имитация	66,84	82,81	2,75	17,19
AD-1955	87,44	102,07	3,64	4,08
Необработанные	100,00	100,00	15,25	18,37

Таблица 15

Значения IC_{50} в клетках Hep3В с модифицированными и немодифицированными иРНК

ID дуплекса	IC_{50} (пМ)	STDEV
AD-58143.1	36,35	12,26
AD-58149.1	5,735	6,196
AD-58161.1	78,12	26,64
AD-58167.1	31,03	18,14
AD-58173.1	29,12	16,53
AD-58236.1	52,73	32,02
AD-58242.1	8,859	4,321
AD-58260.1	7,706	5,094
AD-58263.1	96,64	47,61

Таблица 16

Значения IC_{50} в первичных гепатоцитах мыши с модифицированными и немодифицированными иРНК

ID дуплекса	IC_{50} (пМ)	STDEV
AD-58260.1	1,015	0,9676
AD-58149.1	1,309	1,749
AD-58167.1	1,991	2,477
AD-58242.1	0,5866	1,8
AD-58236.1	0,4517	0,06392
AD-58143.1	0,8876	0,1613
AD-58279.1	3,116	0,7368
AD-58252.1	7,153	1,021
AD-58173.1	7,144	19,88
AD-58263.1	3,224	5,478

Пример 3. Скрининг *in vivo*.

Выбирали подгруппу семи GalNAC-конъюгированных иРНК для дальнейшего исследования *in vivo*.

Мышам линии C57BL/6 (количество=3 на группу) подкожно инъецировали 10 мг/кг GalNAC-конъюгированных дуплексов или равным объемом 1× физиологического раствора, забуференного фосфатом Дульбекко (DPBS) (Life Technologies, номер по каталогу 14040133). Сорок восемь часов спустя мышей умерщвляли и иссекали печень и мгновенно замораживали в жидком азоте. Печень измельчали в 2000 Geno/Grinder (SPEX, SamplePrep, Metuchen, Нью-Джерси). Применяли приблизительно 10 мг порошка печени на образец для выделения РНК. Образцы сначала гомогенизировали в TissueLyserII (Qiagen Inc., Валенсия, Калифорния), а затем экстрагировали РНК с набора RNeasy 96 Universal Tissue Kit (Qiagen Inc., номер по каталогу 74881) в соответствии с протоколом производителя с использованием вакуум/отжим технологии. Концентрацию РНК измеряли NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавэр) и доводили до 100 нг мкл. кДНК и RT-PCR проводили, как описано выше.

Результаты теста разовой дозы показаны на фиг. 2. Табл. 17 показывает результаты теста разовой дозы *in vivo* с указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества mRNA по отношению к обработанным DPBS мышам. В столбце "Эксперименты" перечислен ряд экспериментов, из которых было рассчитано среднее значение. Стандартное отклонение вычисляли у всех мышей в группе во всех анализируемых экспериментах.

Таблица 17

Тест разовой дозы C5 in vivo			
ID дуплекса	Эксперименты	AVG	STDEV
AD-58088.2	2	82,66	13,54
AD-58644.1	1	37,79	9,63
AD-58651.1	1	75,33	5,21
AD-58099.2	2	71,94	15,45
AD-58641.1	1	20,09	4,09
AD-58648.1	1	48,43	9,07
AD-58111.2	3	67,17	13,60
AD-58642.1	2	21,78	5,32
AD-58649.1	1	45,30	14,02
AD-58116.2	2	70,16	10,32
AD-58647.1	1	26,77	4,14
AD-58654.1	1	50,06	27,85
AD-58121.2	2	52,56	13,00
AD-58645.1	1	24,60	1,29
AD-58652.1	1	52,67	3,87
AD-58123.2	2	65,70	9,60
AD-58643.1	1	23,21	2,41
AD-58650.1	1	46,75	14,10
AD-58133.2	3	51,98	13,45
AD-58646.1	2	28,67	5,34
AD-58653.1	1	43,02	10,61
PBS	3	100,00	9,03

Две наиболее эффективных GalNa- конъюгированных иРНК далее модифицировали с включением дополнительных фосфотиоатных связей (табл. 18) и эффективность этих дуплексов определяли in vivo, как описано выше. Результаты теста разовой дозы показаны на фиг. 3 и демонстрируют, что средства, представляющие собой иРНК, с дополнительными фосфотиоатными связями являются более эффективными, чем те средства, представляющие собой иРНК, которые не имеют или содержат меньшее количество фосфотиоатных связей.

Таблица 18

GalNAC-конъюгированные иРНК C5, модифицированные фосфотиоатными связями							
ID дуплекса	Смысловая нить	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Перекрестная Реактивность
AD-58642.1	A-119324.1	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	551	A-119325.1	asUfsuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsasa	555	HumRheMusRat
AD-58111.2	A-118316.1	GfaCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	552	A-118317.1	aUfuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsAfsa	556	HumRheMusRat
AD-58646.1	A-119332.1	CfsasGfaUfcAfaAfCfuAfaAfuUfuUfcAfgUfL96	553	A-119333.1	asCfsuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgscsa	557	MusRat
AD-58133.2	A-118386.1	CfaGfaUfcAfaAfCfuAfaAfuUfuUfcAfgUfL96	554	A-118387.1	aCfuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgscfsa	558	MusRat

С учетом влияния дополнительных фосфотиоатных связей на способности сайленсинга у средств, представляющих собой иРНК, описанных выше, эффективность дополнительных дуплексов GalNAC-конъюгированной РНК, содержащей фосфотиоатные связи (табл. 19), определяли in vivo, как описано выше. Результаты этого теста разовой дозы показаны на фиг. 4.

Продолжительность сайленсинга AD-58642 in vivo определяли путем введения разовой дозы 2,5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг крысам и определения количества белка C5 (фиг. 5B), присутствующего

на 7-й день, и активность белка C5 (фиг. 5A), присутствующего на дни 4 и 7. Как показано на фиг. 5, присутствует 50% уменьшение активности белка C5 по 4-й день при дозе 25 мг/кг и больше, чем на 70% снижение активности белка C5 в день 7.

Количество белка C5 определяли с помощью вестерн-блоттинга всей сыворотки. Активность белка C5 определяли в реакции гемолиза. Вкратце, фиксированное разведение C5 человека, обедненная сывороткой человека, смешивали с сывороткой мыши и инкубировали с антитело-покрытыми эритроцитами барана в течение 1 ч. Измеряли поглощение гемоглобина и рассчитывали % гемолиза по сравнению с эталонной кривой (полученной с применением серии разведений сыворотки мыши).

Эффективность AD-58642 *in vivo* также анализировали у мышей после однократного подкожного введения 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 25 мг/кг AD-58642. На 5-й день анализировали мРНК C5 в образцах печени с применением qPCR, активность C5 анализировали по гемолизу и количество белка C5 определяли с помощью анализа вестерн-блот всей сыворотки.

Как показано на фиг. 6A и 6B, хотя имеется только незначительное улучшение (т.е. приблизительно 5%) в эффективности AD-58642 ингибировать мРНК C5 при дозе 25 мг/кг по сравнению с 10 мг/кг, в среднем наблюдается 85% сайленсинг при дозе 25 мг/кг. Кроме того, наблюдается эффект доза-ответ при значениях IC_{50} приблизительно 2,5 мг/кг.

На фиг. 7A и 7B, и 8 продемонстрировано, что AD-58642 является эффективным для уменьшения количества белка C5 (фиг. 8) и активности белка C5 (7A и 7B).

Продолжительность сайленсинга AD-58641 *in vivo* определяли путем введения разовой дозы 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг AD-58641 мышам линии C57BL/6 (количество=3) и определения количества белка C5, присутствующего в этих животных в дни 5 и 9 с помощью анализа ELISA. Вкратце, собирали сыворотку в день 0, предварительно отобранная, и на 5-й день и 9-й день определяли количественно уровни белков C5 с помощью ELISA. Уровни белка C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке. Как показано на фиг. 9, результаты демонстрируют, что существует дозозависимый эффект и длительный "нождаун" белка C5 в сыворотке (разовая доза ED_{50} составляла 0,6 мг/кг).

Также испытывали соединение AD-58641 на эффективность применения протокола введения нескольких доз на мышах линии C57BL/6. Мышам подкожно вводили соединение AD-58641 в дозе 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг или в дозе 2,5 мг/кг в дни 0, 1, 2, и 3. Сыворотку собирали в дни 0 и 8, как показано на фиг. 10, и анализировали на уровень белка C5 с помощью ELISA. Уровни C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке. На фиг. 10 показано, что применение нескольких доз AD-58641 приводит к сайленсингу белка C5 при всех тестируемых дозах на уровне больше чем 90% сайленсинга белка C5 при дозе 2,5 мг/кг.

Соединение AD-58641 дополнительно испытывали на эффективность и оценивали кумулятивный эффект соединения на крысах с применением протокола повторного введения. Крысам линии Sprague Dawley дикого типа производили подкожную инъекцию соединения AD-58641 в дозе 2,5 мг/кг/доза или 5,0 мг/кг/доза дважды в неделю в течение 3 недель (q2w ×3). Сыворотку собирали на день 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25 и 32. Гемолитическую активность сыворотки измеряли с применением реакции гемолиза, в котором 1:150 разбавление сыворотки крыс инкубировали с сенсibilизированными клетками крови барана и крысы в GVB++-буфере в течение 1 ч и оценивали количественно высвобождение гемоглобина путем измерения оптической плотности при 415 нм (см. фиг. 11A). Количество C5 белка, присутствующего в образцах, также определяли с помощью ELISA (фиг. 11B). Полученные результаты демонстрируют дозозависимый эффект и длительное снижение гемолитической активности, достижение приблизительно 90% ингибирования гемолитической активности.

Таблица 19

Дополнительные GalNAc-конъюгированные иРНК C5, модифицированные фосфотиоатными связями

ID дуплекса	Смысловая нить	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Начальное положение	Перекрестная Реактивность	PS#
AD-58088.2	A-118324.1	AfuUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	559	A-118325.1	aAfaGfgUfaCfuUfguuGfuUfuAfaAfcCfsu	580	984	HumRheMus	2
AD-58644.1	A-119328.1	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	560	A-119329.1	asAfsaGfgUfaCfuUfguuGfuUfuAfaAfcCfsu	581	984	HumRheMus	6
AD-58651.1	A-119328.2	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	561	A-119339.1	asAfsaGfgUfsaCfsuUfsguuGfsuUfsuAfsaAfsuscfsu	582	984	HumRheMus	14
AD-58099.2	A-118312.1	UfgAfcAfaAfaUfaAfcUfcAfcUfaUfaAfl96	562	A-118313.1	uUfaUfaGfuGfaGfuuaUfuUfuGfuCfasAfsu	583	1513	HumRheMusRat	2
AD-58641.1	A-119322.1	UfsgsAfcAfaAfaUfaAfcUfcAfcUfaUfaAfl96	563	A-119323.1	usUfsaUfaGfuGfaGfuuaUfuUfuGfuCfasasu	584	1513	HumRheMusRat	6
AD-58648.1	A-119322.2	UfsgsAfcAfaAfaUfaAfcUfcAfcUfaUfaAfl96	564	A-119336.1	usUfsaUfsaGfsuGfsaGfsuuaUfsuUfsuGfsuCfsasasu	585	1513	HumRheMusRat	14
AD-58111.2	A-118316.1	GfaCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	565	A-118317.1	aUfuAfuAfgUfgUfguuAfuUfuUfgUfcsAfsa	586	1514	HumRheMusRat	2
AD-58642.1	A-119324.1	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	566	A-119325.1	asUfsuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsasa	587	1514	HumRheMusRat	6
AD-58649.1	A-119324.2	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	567	A-119337.1	asUfsuAfsuAfsuUfsgAfsuuAfsuUfsuUfsgUfscsasa	588	1514	HumRheMusRat	14
AD-58116.2	A-118396.1	GfuUfcCfgGfaUfaUfuUfgAfaCfuUfuUfL96	568	A-118397.1	aAfaAfgUfuCfaAfaUfaUfcCfgGfaAfcCfsu	589	4502	MusRat	2

AD-58647.1	A-119334.1	GfsusUfcCfgGfaUfAfUfuUfgAfaCfuUfuUfL96	569	A-119335.1	asAfsaAfgUfuCfaAfaUfCfcGfaAfcscsg	590	4502	MusRat	6
AD-58654.1	A-119334.2	GfsusUfcCfgGfaUfAfUfuUfgAfaCfuUfuUfL96	570	A-119342.1	asAfsaAfsGufsuCfsaAfsauUfscCfsgGfsaAfcscsg	591	4502	MusRat	14
AD-58121.2	A-118382.1	UfgCfaGfaUfcAfaAfcAfcAfaUfuUfcAfL96	571	A-118383.1	uGfaAfaUfuGfuGfuUgfaUfcUfgCfasGfsa	592	4945	MusRat	2
AD-58645.1	A-119330.1	UfsgsCfaGfaUfcAfaAfcAfcAfaUfuUfcAfL96	572	A-119331.1	usGfsaAfaUfuGfuGfuUgfaUfcUfgCfasgsa	593	4945	MusRat	6
AD-58652.1	A-119330.2	UfsgsCfaGfaUfcAfaAfcAfcAfaUfuUfcAfL96	573	A-119340.1	usGfsaAfsaUfsuGfsuGfsuuGfsaUfscUfsgCfsasgsa	594	4945	MusRat	14
AD-58123.2	A-118320.1	AfaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	574	A-118321.1	uAfuUfaUfaAfaAfaUfCfuUfgCufusUfsu	595	786	HumRheMus	2
AD-58643.1	A-119326.1	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	575	A-119327.1	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfCfuUfgCufusus	596	786	HumRheMus	6
AD-58650.1	A-119326.2	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	576	A-119338.1	usAfsuUfsaUfsaAfsaAfsauUfscUfsuGfscUfsusu	597	786	HumRheMus	14
AD-58133.2	A-118386.1	CfaGfaUfcAfaAfcAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	577	A-118387.1	aCfuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgsCfsa	598	4947	MusRat	2
AD-58646.1	A-119332.1	CfsasGfaUfcAfaAfcAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	578	A-119333.1	asCfsuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgscsa	599	4947	MusRat	6
AD-58653.1	A-119332.2	CfsasGfaUfcAfaAfcAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	579	A-119341.1	asCfsuGfsaAfsaUfsuGfsuguUfsuGfsaUfscUfsgcsa	600	4947	MusRat	14

Пример 4. Конструирование, синтез и скрининг дополнительных siRNA in vitro конструирование siRNA.

Дуплексы C5 длиной 19 нуклеотидов как для смысловой, так и антисмысловой цепи конструировали с применением последовательности мРНК C5 человека, представленной в GenBank, № NM_001735.2. Первоначально определили пятьсот шестьдесят девять дуплексов, не содержащих повторы длиннее, чем 7 нуклеотидов, охватывая по существу весь 5480-нуклеотидный транскрипт. Все 569 дуплексов затем оценивали на предсказанную эффективность в соответствии с линейной моделью, которая оценивает пары нуклеотидов в каждом положении дуплекса, а доза и клеточная линия применяют для скрининга. Дуплексы также сопоставляли со всеми транскриптами в коллекции RefSeq человека, используя собственный алгоритм полного перебора, и считали наименьшие значения несовпадений (на цепь) к транскриптам, отличным от C5. Дуплексы синтезировали и подвергали скринингу, а затем выбирали из 569, в соответствии со следующей схемой: Начиная с 5'-конца транскрипта, дуплекс выбирали внутри "окна" каждые 10±2 нуклеотидов, которые:

- 1) имели самую высокую предсказанную эффективность,
- 2) имели по меньшей мере одно несовпадение в обеих цепях ко всем транскриптам, отличным от SERPIN1,

3) еще не были синтезированы и не подвергались скринингу как часть других наборов дуплексов.

Если в данном окне не был идентифицирован дуплекс, который удовлетворял всем критериям, то окно пропускали.

Подробный список из 569 последовательностей смысловой и антисмысловой цепи C5 показан в табл. 20.

Эффективность *in vitro* дуплексов, содержащих смысловую и антисмысловую последовательности, приведенные в табл. 20, определяли с помощью следующих способов.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки HepG2 (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной поддерживающей среде Игла (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), перед отделением 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 каждого из 164 дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. 80 мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~2,5×10⁴ клеток HepG2, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты выполняли при значении 20 нМ и включали наивные клетки и клетки, трансфицированные AD-1955, люцифераза-нацеленная siRNA в качестве отрицательного контроля.

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 700об/мин на качалке 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 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 буфера элюирования 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 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин. Удаляли 40 мкл супернатанта, содержащего выделенную РНК, 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 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли 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 смеси мастер-микса, содержащей 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (Applied Biosystems, номер по каталогу 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для SERPINC1 человека (Applied Biosystems, номер по каталогу Hs00892758_m1) и 5 мкл зонда мастер-микс Lightcycler 480 (Roche, номер по каталогу 04887301001) в каждую лунку 384-луночного планшета (Roche, номер по каталогу 04887301001). PCR в режиме реального времени проводили в приборе LC480 Real Time PCR (Roche).

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением $\Delta\Delta C_t$ -способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 20 нМ AD-1955.

Дополнительные последовательности немодифицированной и антисмысловой цепи С5

Название олигонуклеотида	Положение в NM_001735.2	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
NM_001735.2_3-21_s	3-21	UAUCCGGUGUUUCCUGCUA	601	UAGCAGGAAACCACGGUAU	1170
NM_001735.2_10-28_s	10-28	GGUUUCCUGCUACCUCCAA	602	UUGGAGGUAGCAGGAAACC	1171
NM_001735.2_22-40_s	22-40	CCUCCAACCAUGGGCCUUU	603	AAAGGCCCAUGGUUGGAGG	1172
NM_001735.2_33-51_s	33-51	GGGCCUUUUGGAAUACUU	604	AAGUAUCCCAAAGGCC	1173
NM_001735.2_43-61_s	43-61	GGAAUACUUUGUUUUUAA	605	UUA AAAAACAAAGUAUCC	1174
NM_001735.2_49-67_s	49-67	CUUUGUUUUUAUUCUCC	606	GGAAGAUUAAAAACAAG	1175
NM_001735.2_63-81_s	63-81	CUUCCUGGGAAAACCUUG	607	CCAGGUUUUCCCCAGGAAG	1176
NM_001735.2_71-89_s	71-89	GGAAAACCUUGGGACAGGA	608	UCCUGUCCCCAGGUUUCC	1177
NM_001735.2_81-99_s	81-99	GGGACAGGAGCAAACAUU	609	AUAUGUUUGCUCCUGUCC	1178
NM_001735.2_91-109_s	91-109	CAAACAUAUGUCAUUUCAG	610	CUGAAAUGACAUAUGUUUG	1179
NM_001735.2_102-120_s	102-120	CAUUUCAGCACCAAAAUA	611	UAUUUUUGGUGCUGAAAUG	1180
NM_001735.2_109-127_s	109-127	GCACCAAAAUAUUCGUG	612	CACGGAAUAUUUUUGGUGC	1181
NM_001735.2_123-141_s	123-141	CCGUGUUGGAGCAUCUGAA	613	UUCAGAUGCUGCAACACGG	1182
NM_001735.2_130-148_s	130-148	GGAGCAUCUGAAAAUAUUG	614	CAAUAUUUCAGAUGCUC	1183
NM_001735.2_139-157_s	139-157	GAAAAUAUUGAUUCAAG	615	CUUGAAUCACAUAUUUUC	1184
NM_001735.2_150-168_s	150-168	GAUUCAAGUUUAUGGAUAC	616	GUAUCCAUA AACUUGAAUC	1185
NM_001735.2_163-181_s	163-181	GGAUACACUGAAGCAUUUG	617	CAAUGCUUCAGUGUAUCC	1186
NM_001735.2_172-190_s	172-190	GAAGCAUUUGAUGCAACAA	618	UUGUUGCAUCAAUGCUUC	1187
NM_001735.2_183-201_s	183-201	UGCAACAUCUCUAUUA AAA	619	UUUAAUAGAGAUUGUUGCA	1188
NM_001735.2_189-207_s	189-207	AAUCUCUAUUA AAAAGUUU	620	AUAACUUUUAAUAGAGAUU	1189
NM_001735.2_201-219_s	201-219	AAGUUUCCUGAUAAAAAA	621	UUUUUUAUCAGGAUAACUU	1190

NM_001735.2_209-227_s	209-227	CUGAUAAAAAAAAUUAGUUA	622	UAACUAAUUUUUUUAUCAG	1191
NM_001735.2_221-239_s	221-239	UUAGUUACUCCUCAGGCCA	623	UGGCCUGAGGAGUAACUAA	1192
NM_001735.2_230-248_s	230-248	CCUCAGGCCAUGUUCAUUU	624	AAAUGAACAUGGCCUGAGG	1193
NM_001735.2_242-260_s	242-260	UUCAUUUAUCCUCAGAGAA	625	UUCUCUGAGGAUAAAUGAA	1194
NM_001735.2_252-270_s	252-270	CUCAGAGAAUAAAUUCCAA	626	UUGGAAUUUAUUCUCUGAG	1195
NM_001735.2_259-277_s	259-277	AAUAAAUUCCAAAACUCUG	627	CAGAGUUUUGGAAUUUAUU	1196
NM_001735.2_273-291_s	273-291	CUCUGCAAUCUUAACAAUA	628	UAUUGUUUAGAUUGCAGAG	1197
NM_001735.2_282-300_s	282-300	CUUAACAUAACAACCAAAA	629	UUUUGGUUGUAUUGUUAAG	1198
NM_001735.2_292-310_s	292-310	CAACCAAAACAUAUGCCUG	630	CAGGCAAUUGUUUUGGUUG	1199
NM_001735.2_301-319_s	301-319	CAAUUGCCUGGAGGACAAA	631	UUUGUCCUCCAGGCAAUUG	1200
NM_001735.2_313-331_s	313-331	GGACAAAACCCAGUUUCUU	632	AAGAAACUGGGUUUUGUCC	1201
NM_001735.2_322-340_s	322-340	CCAGUUUCUUAUGUGUAUU	633	AAUACACAUAGAAACUGG	1202
NM_001735.2_332-350_s	332-350	AUGUGUAUUUGGAAGUUGU	634	ACAACUCCAAAUAACACAU	1203
NM_001735.2_342-360_s	342-360	GGAAGUUGUAUCAAGCAU	635	AUGCUUUGAUACAACUCC	1204
NM_001735.2_349-367_s	349-367	GUAUCAAGCAUUUUUCAA	636	UUGAAAAUUGCUUUGAUAC	1205
NM_001735.2_361-379_s	361-379	UUUUCAAAAUCAAAAAGAA	637	UUCUUUUUGAUUUUGAAAA	1206
NM_001735.2_371-389_s	371-389	CAAAAAGAAUGCCAUAAC	638	GUUAUUGGCAUUCUUUUUG	1207
NM_001735.2_381-399_s	381-399	GCCAAUAACCUAUGACAAU	639	AUUGUCAUAGGUUAUUGGC	1208
NM_001735.2_389-407_s	389-407	CCUAUGACAAUGGAUUUCU	640	AGAAAUCCAUUGUCAUAGG	1209
NM_001735.2_399-417_s	399-417	UGGAUUUCUCUUCAUUCAU	641	AUGAAUGAAGAGAAAUCCA	1210
NM_001735.2_411-429_s	411-429	CAUUCAUACAGACAAACCU	642	AGGUUUGUCUGUAUGAAUG	1211
NM_001735.2_419-437_s	419-437	CAGACAAACCGUUUAUAC	643	GUAUAAACAGGUUUGUCUG	1212
NM_001735.2_430-448_s	430-448	GUUUUAUACUCCAGACCAGU	644	ACUGGUCUGGAGUAUAAAC	1213
NM_001735.2_441-459_s	441-459	AGACCAGUCAGUAAAAGUU	645	AACUUUUACUGACUGGUCU	1214

NM_001735.2_450-468_s	450-468	AGUAAAAGUUAGAGUUUUAU	646	AUAAACUCUAACUUUUACU	1215
NM_001735.2_460-478_s	460-478	AGAGUUUAUUCGUUGAAUG	647	CAUUCAACGAAUAAACUCU	1216
NM_001735.2_470-488_s	470-488	CGUUGAAUGACGACUUGAA	648	UUCAAGUCGUCAUUCAACG	1217
NM_001735.2_483-501_s	483-501	CUUGAAGCCAGCCAAAAGA	649	UCUUUUGGCUGGCCUUAAG	1218
NM_001735.2_490-508_s	490-508	CCAGCCAAAAGAGAAACUG	650	CAGUUUCUCUUUUGGCUGG	1219
NM_001735.2_503-521_s	503-521	AAACUGUCUUAACUUUCAU	651	AUGAAAGUUUAGACAGUUU	1220
NM_001735.2_513-531_s	513-531	AACUUUCAUAGAUCUGAA	652	UUCAGGAUCUAUGAAAGUU	1221
NM_001735.2_519-537_s	519-537	CAUAGAUCUGAAGGAUCA	653	UGAUCCUUCAGGAUCUAUG	1222
NM_001735.2_529-547_s	529-547	GAAGGAUCAGAAGUUGACA	654	UGUCAACUUCUGAUCCUUC	1223
NM_001735.2_543-561_s	543-561	UGACAUGGUGAAGAAAUU	655	AAUUUCUUCUACCAUGUCA	1224
NM_001735.2_553-571_s	553-571	GAAGAAAUGAUCUAUUAUG	656	CAAUAUGAUCAAUUUCUUC	1225
NM_001735.2_562-580_s	562-580	GAUCAUAUUGGAAUUAUCU	657	AGAUAAUCCAAUAUGAUC	1226
NM_001735.2_571-589_s	571-589	GGAAUUUUCUCUUUCCUG	658	CAGGAAAAGAGAAUUAUCC	1227
NM_001735.2_579-597_s	579-597	CUCUUUCCUGACUUAAG	659	CUUGAAGUCAGGAAAAGAG	1228
NM_001735.2_590-608_s	590-608	ACUUCAAGAUUCCGUCUAA	660	UUAGACGGAAUCUUGAAGU	1229
NM_001735.2_601-619_s	601-619	CCGUCUAAUCCUAGAUUG	661	CAUAUCUAGGAUUAGACGG	1230
NM_001735.2_610-628_s	610-628	CCUAGAUUGGUAUGUGGA	662	UCCACAUACCAUAUCUAGG	1231
NM_001735.2_623-641_s	623-641	UGUGGACGAUCAAGGCUAA	663	UUAGCCUUGAUCGUCCACA	1232
NM_001735.2_629-647_s	629-647	CGAUCAAGGCUAAAUAUAA	664	UUUAUUUAGCCUUGAUCG	1233
NM_001735.2_642-660_s	642-660	AUAUAAAGAGACUUUUCA	665	UGAAAAGUCCUCUUUAUUAU	1234
NM_001735.2_649-667_s	649-667	GAGGACUUUUAACAACUG	666	CAGUUGUUGAAAAGUCCUC	1235
NM_001735.2_662-680_s	662-680	CAACUGGAACCGCAUUAUU	667	AAAUAUGCGGUCCAGUUG	1236
NM_001735.2_672-690_s	672-690	CGCAUUAUUUGAAGUAAA	668	UUUAACUCAAUAUUGCG	1237
NM_001735.2_683-701_s	683-701	AAGUUAAGAAUUGUCUU	669	AAGACUAUUCUUUAACUU	1238

NM_001735.2_691-709_s	691-709	GAAUAUGUCUUGCCACAAU	670	AAUGUGGCAAGACAUAUUC	1239
NM_001735.2_703-721_s	703-721	CCACAUUUUUCUGUCUCAA	671	UUGAGACAGAAAAAUGUGG	1240
NM_001735.2_713-731_s	713-731	CUGUCUCAAUCCGAGCCAGA	672	UCUGGCUCGAUUGAGACAG	1241
NM_001735.2_719-737_s	719-737	CAAUCGAGCCAGAAUUAUA	673	UUAUAUUCUGGCUCGAUUG	1242
NM_001735.2_730-748_s	730-748	GAAUAUAAUUUCAUUGGUU	674	AACCAAUGAAAAUUAUUC	1243
NM_001735.2_742-760_s	742-760	AUUGGUUACAAGAACUUUA	675	UAAAGUUCUUGUAACCAAU	1244
NM_001735.2_752-770_s	752-770	AGAACUUUAAGAAUUUUGA	676	UCAAAAUUCUUAAGUUCU	1245
NM_001735.2_762-780_s	762-780	GAAUUUUGAAAAUACUUA	677	UAUAGUAAUUUCAAUUUC	1246
NM_001735.2_769-787_s	769-787	GAAUUUACUUAUAAAAGCAA	678	UUGCUUUUAUAGUAAUUUC	1247
NM_001735.2_781-799_s	781-799	AAAGCAAGAUUUUUUAUA	679	UAUAAAAUAUCUUGCUUU	1248
NM_001735.2_789-807_s	789-807	AUAUUUUUAUAAUAAAGUA	680	UACUUUAUUUAAAAUAU	1249
NM_001735.2_803-821_s	803-821	AAGUAGUCACUGAGGCUGA	681	UCAGCCUCAGUGACUACUU	1250
NM_001735.2_810-828_s	810-828	CACUGAGGCUGACGUUUUAU	682	AUAAACGUCAGCCUCAGUG	1251
NM_001735.2_822-840_s	822-840	CGUUUUAUACACAUUUGGA	683	UCCAAAUGUGAUUAAACG	1252
NM_001735.2_831-849_s	831-849	CACAUUUGGAAUAGAGAA	684	UUCUCUUUUCCAAAUGUG	1253
NM_001735.2_840-858_s	840-858	AAUAAGAGAAGACUUAAAA	685	UUUUAGUCUUCUCUUAUU	1254
NM_001735.2_852-870_s	852-870	CUUAAAAGAUCAUAAAA	686	UUUUUGAUCAUCUUUUUAG	1255
NM_001735.2_859-877_s	859-877	GAUGAUCAAAAAGAAAUGA	687	UCAUUUCUUUUUGAUCAUC	1256
NM_001735.2_872-890_s	872-890	AAAUGAUGCAAACAGCAAU	688	AUUGCUGUUUGCAUCAUUU	1257
NM_001735.2_883-901_s	883-901	ACAGCAAUGCAAAACACAA	689	UUGUGUUUUGCAUUGCGU	1258
NM_001735.2_893-911_s	893-911	AAAACACAAUGUUGAUAAA	690	UUUAUCAACAUUGUGUUUU	1259
NM_001735.2_899-917_s	899-917	CAAUGUUGAUAAAUGGAAU	691	AUCCAUUUAUCAACAUUG	1260
NM_001735.2_913-931_s	913-931	GGAAUUGCUCUAGUCACAU	692	AUGUGACUUGAGCAAUCC	1261
NM_001735.2_919-937_s	919-937	GCUCAAGUCACAUUUGAAU	693	AAUCAAAUGUGACUUGAGC	1262

NM_001735.2_930-948_s	930-948	AUUUGAUUCGAAACAGCA	694	UGCUGUUUCAGAAUCAAU	1263
NM_001735.2_939-957_s	939-957	UGAAACAGCAGUCAAGAA	695	UUCUUUGACUGCUGUUUCA	1264
NM_001735.2_951-969_s	951-969	CAAAGAACUGUCAUACUAC	696	GUAGUAUGACAGUUCUUUG	1265
NM_001735.2_962-980_s	962-980	CAUACUACAGUUUAGAAGA	697	UCUUCUAAACUGUAGUAUG	1266
NM_001735.2_969-987_s	969-987	CAGUUUAGAAGAUUUAAC	698	GUUUAAAUCUUCUAAACUG	1267
NM_001735.2_983-1001_s	983-1001	UAAACAACAAGUACUUUA	699	UAAAGGUACUUGUUGUUUA	1268
NM_001735.2_990-1008_s	990-1008	CAAGUACUUUAUUAUUGCU	700	AGCAAUAUAAAGGUACUUG	1269
NM_001735.2_1002-1020_s	1002-1020	UAUUGCUGUAACAGUCAUA	701	UAUGACUGUUACAGCAAUA	1270
NM_001735.2_1011-1029_s	1011-1029	AACAGUCAUAGAGUCUACA	702	UGUAGACUCUUAUGACUGUU	1271
NM_001735.2_1020-1038_s	1020-1038	AGAGUCUACAGGUGGAUUU	703	AAAUCCACUGUAGACUCU	1272
NM_001735.2_1033-1051_s	1033-1051	GGAUUUUCUGAAGAGGCAG	704	CUGCCUCUUCAGAAAUCC	1273
NM_001735.2_1042-1060_s	1042-1060	GAAGAGGCAGAAUACCUG	705	CAGGUUUUCUGCCUCUUC	1274
NM_001735.2_1050-1068_s	1050-1068	AGAAAUACCUGGCAUCAA	706	UUUGAUGCCAGGUUUUCU	1275
NM_001735.2_1061-1079_s	1061-1079	GCAUCAAAUAUGUCCUCUC	707	GAGAGGACAUUUUUGAUGC	1276
NM_001735.2_1071-1089_s	1071-1089	UGUCCUCUCUCCUACAAA	708	UUUGUAGGGAGAGAGGACA	1277
NM_001735.2_1092-1110_s	1092-1110	GAAUUUGGUUGCUACUCCU	709	AGGAGUAGCAACCAAUUC	1278
NM_001735.2_1102-1120_s	1102-1120	GCUACUCCUCUUUCCUGA	710	UCAGGAAAAGAGGAGUAGC	1279
NM_001735.2_1109-1127_s	1109-1127	CUCUUUCCUGAAGCCUGG	711	CCAGGCUUCAGGAAAAGAG	1280
NM_001735.2_1123-1141_s	1123-1141	CCUGGGAUCCAUAUCCCA	712	UGGGUAUUGGAAUCCAGG	1281
NM_001735.2_1133-1151_s	1133-1151	CAUAUCCCAUCAAGGUGCA	713	UGCACCUUGAUGGGUAUUG	1282
NM_001735.2_1139-1157_s	1139-1157	CCAUCAAGGUGCAGGUUAA	714	UUAACCGCACCUGAUGG	1283
NM_001735.2_1150-1168_s	1150-1168	CAGGUAAAAGAUUCGCUUG	715	CAAGCGAAUCUUUAACCUG	1284
NM_001735.2_1161-1179_s	1161-1179	UUCGCUUGACCAGUUGGUA	716	UACCAACUGGUCAAGCGAA	1285
NM_001735.2_1170-1188_s	1170-1188	CCAGUUGGUAGGAGGAGUC	717	GACUCCUCCUACCAACUGG	1286

NM_001735.2_1180-1198_s	1180-1198	GGAGGAGUCCCAGUAACAC	718	GUGUUACUGGGACUCCUCC	1287
NM_001735.2_1190-1208_s	1190-1208	CAGUAACACUGAAUGCACA	719	UGUGCAUUCAGUGUUACUG	1288
NM_001735.2_1200-1218_s	1200-1218	GAAUGCACAAACAAUUGAU	720	AUCAAUUGUUUGUGCAUUC	1289
NM_001735.2_1209-1227_s	1209-1227	AACAAUUGAUGUAAACCAA	721	UUGGUUUACAUCAAUUGUU	1290
NM_001735.2_1220-1238_s	1220-1238	UAAACCAAGAGACAUCUGA	722	UCAGAUGUCUCUUGGUUUA	1291
NM_001735.2_1232-1250_s	1232-1250	CAUCUGACUUGGAUCCAAG	723	CUUGGAUCCAAGUCAGAUG	1292
NM_001735.2_1243-1261_s	1243-1261	GAUCCAAGCAAAAGUGUAA	724	UUACACUUUUGCUUGGAUC	1293
NM_001735.2_1251-1269_s	1251-1269	CAAAAGUGUAACACGUGUU	725	AACACGUGUUACACUUUUG	1294
NM_001735.2_1260-1278_s	1260-1278	AACACGUGUUGAUGAUGGA	726	UCCAUCAUCAACACGUGUU	1295
NM_001735.2_1272-1290_s	1272-1290	UGAUGGAGUAGCUUCCUUU	727	AAAGGAAGCUACUCCAUCA	1296
NM_001735.2_1279-1297_s	1279-1297	GUAGCUUCCUUUGUGCUUA	728	UAAGCACAAAGGAAGCUAC	1297
NM_001735.2_1293-1311_s	1293-1311	GCUUAAUCUCCCAUCUGGA	729	UCCAGAUGGGAGAUUAAGC	1298
NM_001735.2_1303-1321_s	1303-1321	CCAUCUGGAGUGACGGUGC	730	GCACCGUCACUCCAGAUGG	1299
NM_001735.2_1313-1331_s	1313-1331	UGACGGUGCUGGAGUUUAA	731	UUAAACUCCAGCACCGUCA	1300
NM_001735.2_1320-1338_s	1320-1338	GCUGGAGUUUAAUGUCAAA	732	UUUGACAUUAAACUCCAGC	1301
NM_001735.2_1332-1350_s	1332-1350	UGUCAAAACUGAUGCUGCA	733	UGGAGCAUCAGUUUUGACA	1302
NM_001735.2_1342-1360_s	1342-1360	GAUGCUCAGAUUCUCCAG	734	CUGGAAGAUUCUGGAGCAUC	1303
NM_001735.2_1349-1367_s	1349-1367	CAGAUCUCCAGAAGAAAA	735	UUUUCUUCUGGAAGAUCUG	1304
NM_001735.2_1362-1380_s	1362-1380	AGAAAAUCAGGCCAGGGAA	736	UUCCUUGGCCUGAUUUUCU	1305
NM_001735.2_1371-1389_s	1371-1389	GGCCAGGGAAGGUUACCGA	737	UCGGUAACCUUCCUGGCC	1306
NM_001735.2_1382-1400_s	1382-1400	GUUACCGAGCAAUAGCAUA	738	UAUGCUAUUGCUCGGUAAC	1307
NM_001735.2_1393-1411_s	1393-1411	AUAGCAUACUCAUCUCUCA	739	UGAGAGAUGAGUAUGCUAU	1308
NM_001735.2_1399-1417_s	1399-1417	UACUCAUCUCUCAGCCAAA	740	UUUGGCUGAGAGAUGAGUA	1309
NM_001735.2_1412-1430_s	1412-1430	GCCAAAGUUACCUUUAUUAU	741	AUAUAAAGGUAACUUUGGC	1310

NM_001735.2_1422-1440_s	1422-1440	CCUUUAUUAUGAUUGGACU	742	AGUCCAAUCAAAUAAAAGG	1311
NM_001735.2_1432-1450_s	1432-1450	GAUUGGACUGAUACCAUA	743	UAUGGUUAUCAGUCCAAUC	1312
NM_001735.2_1439-1457_s	1439-1457	CUGAUAACCAUAAGGCUUU	744	AAAGCCUUAUGGUUAUCAG	1313
NM_001735.2_1451-1469_s	1451-1469	AGGCUUUGCUAGUGGGAGA	745	UCUCCCACUAGCAAAGCCU	1314
NM_001735.2_1462-1480_s	1462-1480	GUGGGAGAACAUCUGAAUA	746	UAUUCAGAUGUUCUCCAC	1315
NM_001735.2_1471-1489_s	1471-1489	CAUCUGAAUUAUUGUUA	747	UAACAAUAAUUAUCAGAUG	1316
NM_001735.2_1479-1497_s	1479-1497	UAUUUAUUGUUACCCCAAA	748	UUUGGGGUAAACAAUAAUA	1317
NM_001735.2_1492-1510_s	1492-1510	CCCAAAAGCCCAUUAUUG	749	CAAUAUAUGGGCUUUUGG	1318
NM_001735.2_1493-1511_s	1493-1511	CCAAAAGCCCAUUAUUGA	750	UCAAAUAUUGGGCUUUUG	1319
NM_001735.2_1494-1512_s	1494-1512	CAAAAGCCCAUUAUUGAC	751	GUCAAAUAUUGGGCUUUUG	1320
NM_001735.2_1495-1513_s	1495-1513	AAAAGCCCAUUAUUGACA	752	UGUCAAAUAUUGGGCUUUU	1321
NM_001735.2_1496-1514_s	1496-1514	AAAGCCCAUUAUUGACAA	753	UUGUCAAAUAUUGGGCUUU	1322
NM_001735.2_1497-1515_s	1497-1515	AAGCCCAUUAUUGACAAA	754	UUUGUCAAAUAUUGGGCUU	1323
NM_001735.2_1498-1516_s	1498-1516	AGCCCAUUAUUGACAAA	755	UUUUGUCAAAUAUUGGGCU	1324
NM_001735.2_1499-1517_s	1499-1517	GCCCAUUAUUGACAAAUA	756	AUUUUGUCAAAUAUUGGGC	1325
NM_001735.2_1500-1518_s	1500-1518	CCCAUUAUUGACAAAUA	757	UAUUUUGUCAAAUAUUGGG	1326
NM_001735.2_1501-1519_s	1501-1519	CCAUAUUAUUGACAAAUA	758	UUAUUUUGUCAAAUAUUGG	1327
NM_001735.2_1502-1520_s	1502-1520	CAUAUAUUGACAAAUAAC	759	GUUAUUUUGUCAAAUAUUG	1328
NM_001735.2_1503-1521_s	1503-1521	AUAUAUUGACAAAUAACU	760	AGUUAUUUUGUCAAAUAUAU	1329
NM_001735.2_1504-1522_s	1504-1522	UAUAUUGACAAAUAACUC	761	GAGUUAUUUUGUCAAAUAUA	1330
NM_001735.2_1505-1523_s	1505-1523	AUAUUGACAAAUAACUCA	762	UGAGUUAUUUUGUCAAAUAU	1331
NM_001735.2_1506-1524_s	1506-1524	UAUUGACAAAUAACUCAC	763	GUGAGUUAUUUUGUCAAAUA	1332
NM_001735.2_1507-1525_s	1507-1525	AUUGACAAAUAACUCACU	764	AGUGAGUUAUUUUGUCAAU	1333
NM_001735.2_1508-1526_s	1508-1526	UUGACAAAUAACUCACUA	765	UAGUGAGUUAUUUUGUCAAA	1334

NM_001735.2_1509-1527_s	1509-1527	UGACAAAUAACUCACUAU	766	AUAGUGAGUUUUUUGUCA	1335
NM_001735.2_1510-1528_s	1510-1528	GACAAAUAACUCACUUA	767	UAUAGUGAGUUUUUUGUC	1336
NM_001735.2_1513-1531_s	1513-1531	AAAAUAACUCACUAUAUU	768	AAUUUAGUGAGUUUUUU	1337
NM_001735.2_1514-1532_s	1514-1532	AAAUAACUCACUAUAUU	769	UAAUUUAGUGAGUUUUU	1338
NM_001735.2_1515-1533_s	1515-1533	AAUAACUCACUAUAUUAC	770	GUAUUUAGUGAGUUUUU	1339
NM_001735.2_1516-1534_s	1516-1534	AUAACUCACUAUAUUACU	771	AGUAAUUUAGUGAGUUU	1340
NM_001735.2_1518-1536_s	1518-1536	AACUCACUAUAUUACUUG	772	CAAGUAAUUUAGUGAGUU	1341
NM_001735.2_1519-1537_s	1519-1537	ACUCACUAUAUUACUUGA	773	UCAAGUAAUUUAGUGAGU	1342
NM_001735.2_1520-1538_s	1520-1538	CUCACUAUAUUACUUGAU	774	AUCAAGUAAUUUAGUGAG	1343
NM_001735.2_1521-1539_s	1521-1539	UCACUAUAUUACUUGAUU	775	AAUCAAGUAAUUUAGUGA	1344
NM_001735.2_1523-1541_s	1523-1541	ACUAUAUUACUUGAUUUU	776	AAAAUCAAGUAAUUUAGU	1345
NM_001735.2_1524-1542_s	1524-1542	CUAUAUUACUUGAUUUUA	777	UAAAAUCAAGUAAUUUAG	1346
NM_001735.2_1525-1543_s	1525-1543	UAUAUUACUUGAUUUUAU	778	AUAAAAUCAAGUAAUUUA	1347
NM_001735.2_1526-1544_s	1526-1544	AUAUUACUUGAUUUUAUC	779	GAUAAAAUCAAGUAAUUU	1348
NM_001735.2_1527-1545_s	1527-1545	UAAUUACUUGAUUUUAUCC	780	GGUAAAAUCAAGUAAUU	1349
NM_001735.2_1528-1546_s	1528-1546	AAUUACUUGAUUUUAUCCA	781	UGGAUAAAAUCAAGUAAU	1350
NM_001735.2_1529-1547_s	1529-1547	AUUACUUGAUUUUAUCCAA	782	UUGGAUAAAAUCAAGUAAU	1351
NM_001735.2_1540-1558_s	1540-1558	UUUCCAAGGGCAAAUUA	783	UAAUUUUGCCCUUGGAUA	1352
NM_001735.2_1550-1568_s	1550-1568	GCAAAUUAUCCACUUUGG	784	CCAAGUGGAUAAUUUUGC	1353
NM_001735.2_1561-1579_s	1561-1579	CACUUUGGCACGAGGGAGA	785	UCUCCUCGUGCCAAGUG	1354
NM_001735.2_1571-1589_s	1571-1589	CGAGGGAGAAUUUUCAGA	786	UCUGAAAAUUUCUCCUCG	1355
NM_001735.2_1581-1599_s	1581-1599	AUUUUCAGAUCAUCUUU	787	AUAAGAUGCAUCUGAAAAU	1356
NM_001735.2_1591-1609_s	1591-1609	GCAUCUUUAUCAAGUUA	788	UUUACUUUGAUAGAUGC	1357
NM_001735.2_1600-1618_s	1600-1618	CAAAGUUAACAUCUCCAG	789	CUGGAUGUUUUAUCUUUG	1358

NM_001735.2_1612-1630_s	1612-1630	AUUCCAGUAACACAGAACA	790	UGUUCUGUGUUACUGGAAU	1359
NM_001735.2_1622-1640_s	1622-1640	CACAGAACAUGGUUCCUUC	791	GAAGGAACCAUGUUCUGUG	1360
NM_001735.2_1632-1650_s	1632-1560	GGUUCUUAUCCCCGACUU	792	AAGUCGGGAUGAAGGAACC	1361
NM_001735.2_1643-1661_s	1643-1661	CCCGACUUCUGGUCUAUUA	793	UAAUAGACCAGAAGUCGGG	1362
NM_001735.2_1653-1671_s	1653-1671	GGUCUAUUACAUCGUCACA	794	UGUGACGAUGAAUAGACC	1363
NM_001735.2_1663-1681_s	1663-1681	AUCGUCACAGGAGAACAGA	795	UCUGUUCUCCUGUGACGAU	1364
NM_001735.2_1670-1688_s	1670-1688	CAGGAGAACAGACAGCAGA	796	UCUGCUGUCUGUUCUCCUG	1365
NM_001735.2_1682-1700_s	1682-1700	CAGCAGAAUUAGUGUCUGA	797	UCAGACACUAAUUCUGCUG	1366
NM_001735.2_1693-1711_s	1693-1711	GUGUCUGAUUCAGUCUGGU	798	ACCAGACUGAAUCAGACAC	1367
NM_001735.2_1703-1721_s	1703-1721	CAGUCUGGUAAAUAUUGA	799	UCAAUUUUAACCAGACUG	1368
NM_001735.2_1710-1728_s	1710-1728	GUUAAAUAUUGAAGAAAA	800	UUUUUCUCAAUAUUUAAC	1369
NM_001735.2_1722-1740_s	1722-1740	AGAAAAAUGUGGCAACCAG	801	CUGGUUGCCACAUUUUCU	1370
NM_001735.2_1733-1751_s	1733-1751	GCAACCAGCUCAGGUUCA	802	UGAACCCUGGAGCUGGUUGC	1371
NM_001735.2_1740-1758_s	1740-1758	GCUCCAGGUUCAUCUGUCU	803	AGACAGAUGAACCCUGGAGC	1372
NM_001735.2_1751-1769_s	1751-1769	AUCUGUCUCCUGAUGCAGA	804	UCUGCAUCAGGAGACAGAU	1373
NM_001735.2_1762-1780_s	1762-1780	GAUGCAGAUGCAUAUUCUC	805	GAGAAUUGCAUCUGCAUC	1374
NM_001735.2_1771-1789_s	1771-1789	GCAUAUUCUCCAGGCCAAA	806	UUUGGCCUGGAGAAUAGC	1375
NM_001735.2_1782-1800_s	1782-1800	AGGCCAAACUGUGUCUCUU	807	AAGAGACACAGUUUGGCCU	1376
NM_001735.2_1792-1810_s	1792-1810	GUGUCUCUAAUAUGGCAA	808	UUGCCAUAUUAAGAGACAC	1377
NM_001735.2_1799-1817_s	1799-1817	UUAUAUUGGCAACUGGAAU	809	AUCCAGUUGCCAUAUUA	1378
NM_001735.2_1809-1827_s	1809-1827	AACUGGAAUGGAUCCUGG	810	CCAGGAAUCCAUCAGUU	1379
NM_001735.2_1821-1839_s	1821-1839	UUCCUGGGUGCAUAGCA	811	UGCUAUUGCCACCCAGGAA	1380
NM_001735.2_1830-1848_s	1830-1848	GGCAUUAGCAGCAGUGGAC	812	GUCCACUGCUGCUAAUGCC	1381
NM_001735.2_1842-1860_s	1842-1860	AGUGGACAGUCUGUGUAU	813	AUACACAGCAGUCCACU	1382

NM_001735.2_1852-1870_s	1852-1870	GCUGUGUAUGGAGUCCAAA	814	UUUGGACUCCAUACACAGC	1383
NM_001735.2_1863-1881_s	1863-1881	AGUCCAAAGAGGAGCCAAA	815	UUUGGCUCUCCUUUGGACU	1384
NM_001735.2_1870-1888_s	1870-1888	AGAGGAGCCAAAAAGCCCU	816	AGGGCUUUUUGGCUCUCU	1385
NM_001735.2_1883-1901_s	1883-1901	AGCCCUUGGAAAGAGUAUU	817	AAUACUCUUUCCAAGGGCU	1386
NM_001735.2_1893-1911_s	1893-1911	AAGAGUAUUUCAAUUCUUA	818	UAAGAAUUGAAAUACUCUU	1387
NM_001735.2_1900-1918_s	1900-1918	UUUCAAUUCUUAGAGAAGA	819	UCUUCUCUAAGAAUUGAAA	1388
NM_001735.2_1912-1930_s	1912-1930	GAGAAGAGUGAUCUGGGCU	820	AGCCCAGAUACUCUCUCUC	1389
NM_001735.2_1920-1938_s	1920-1938	UGAUCUGGGCUGUGGGGCA	821	UGCCCCACAGCCCAGAUCA	1390
NM_001735.2_1933-1951_s	1933-1951	GGGGCAGGUGGUGGCCUCA	822	UGAGGCCACCACCUGCCCC	1391
NM_001735.2_1943-1961_s	1943-1961	GUGGCCUCAACAAUGCCAA	823	UUGGCAUUGUUGAGGCCAC	1392
NM_001735.2_1950-1968_s	1950-1968	CAACAAUGCCAAUGUGUUC	824	GAACACAUUGGCAUUGUUG	1393
NM_001735.2_1959-1977_s	1959-1977	CAAUGUGUCCACCUAGCU	825	AGCUAGGUGGAACACAUUG	1394
NM_001735.2_1969-1987_s	1969-1987	CACCUAGCUGACUUACCU	826	AGGUAAGUCCAGCUAGGUG	1395
NM_001735.2_1979-1997_s	1979-1997	GACUUACCUUCCUCACUAA	827	UUAGUGAGGAAGGUAAGUC	1396
NM_001735.2_1991-2009_s	1991-2009	UCACUAAUGCAAUGCAGA	828	UCUGCAUUUGCAUUGAGA	1397
NM_001735.2_2001-2019_s	2001-2019	AAAUGCAGAUGACUCCCAA	829	UUGGGAGUCAUCUGCAUUU	1398
NM_001735.2_2013-2031_s	2013-2013	CUCCCAAGAAAUGAUGAA	830	UUCAUCAUUUUCUUGGGAG	1399
NM_001735.2_2032-2050_s	2032-2050	CCUUGUAAAAGAAAUUCUCA	831	UGAGAAUUUCUUUACAAGG	1400
NM_001735.2_2043-2061_s	2043-2061	AAUUCUCAGGCCAAGAAGA	832	UCUUCUUGGCCUGAGAAUU	1401
NM_001735.2_2053-2071_s	2053-2071	CCAAGAAGAACGCGCAAAA	833	UUUGCAGCGUUCUUCUUGG	1402
NM_001735.2_2063-2081_s	2063-2081	CGCUGCAAAGAAGAUAGA	834	UCUAUCUUCUUUUGCAGCG	1403
NM_001735.2_2070-2088_s	2070-2088	AAAGAAGAUAGAAGAAUA	835	UAUUUCUUCUAUCUUCUUU	1404
NM_001735.2_2082-2100_s	2082-2100	AGAAAUAGCUGCUAAAUU	836	AUAUUUAGCAGCUAUUUCU	1405
NM_001735.2_2089-2107_s	2089-2107	GCUGCUAAAUAUAAACAUU	837	AAUGUUUAUUUAGCAGC	1406

044245

NM_001735.2_2103-2121_s	2103-2121	ACAUUCAGUAGUGAAGAAA	838	UUUCUUCACUACUGAAUGU	1407
NM_001735.2_2110-2128_s	2110-2128	GUAGUGAAGAAAUGUUGUU	839	AACAACAUUUUCUACUAC	1408
NM_001735.2_2119-2137_s	2119-2137	AAAUGUUGUUACGAUGGAG	840	CUCCAUCGUAACAACAUUU	1409
NM_001735.2_2130-2148_s	2130-2148	CGAUGGAGCCUGCGUUAU	841	AUUAACGCAGGCCUCCAUCG	1410
NM_001735.2_2142-2160_s	2142-2160	CGUUAUAUAUGAUGAAACC	842	GGUUUCAUCAUUAUAACG	1411
NM_001735.2_2150-2168_s	2150-2168	AUGAUGAAACCUGUGAGCA	843	UGCUCACAGGUUUCAUCAU	1412
NM_001735.2_2160-2178_s	2160-2178	CUGUGAGCAGCGAGCUGCA	844	UGCAGCUCGCUGCUCACAG	1413
NM_001735.2_2170-2188_s	2170-2188	CGAGCUCACGGAUUAGUU	845	AACUAAUCCGUGCAGCUCG	1414
NM_001735.2_2180-2198_s	2180-2198	GGAUUAGUUUAGGGCCAAG	846	CUUGGCCCUAAACUAAUCC	1415
NM_001735.2_2191-2209_s	2191-2209	GGCCAAGAUGCAUCAAAAG	847	CUUUGAUGCAUCUUGGCC	1416
NM_001735.2_2202-2220_s	2202-2220	CAUCAAAAGCUUUCACUGAA	848	UUCAGUGAAAGCUUUGAUG	1417
NM_001735.2_2209-2227_s	2209-2227	GCUUUCACUGAAUGUUGUG	849	CACAACAUUCAGUGAAAGC	1418
NM_001735.2_2219-2237_s	2219-2237	AAUGUUGUGUCGUCGCAAG	850	CUUGCGACGACACAACAUU	1419
NM_001735.2_2229-2247_s	2229-2247	CGUCGCAAGCCAGCUCCGU	851	ACGGAGCUGGCUUGCGACG	1420
NM_001735.2_2241-2259_s	2241-2259	GCUCGUGCUAAUAUCUCU	852	AGAGAUUUUAGCACGGAGC	1421
NM_001735.2_2249-2267_s	2249-2267	CUAAUAUCUCUCAUAAAGA	853	UCUUUAUGAGAGAUUUUAG	1422
NM_001735.2_2263-2281_s	2263-2281	AAAGACAUGCAAUUGGGAA	854	UUCCCAAUGCAUGUCUUU	1423
NM_001735.2_2272-2290_s	2272-2290	CAAUUGGAAGGCUACACA	855	UGUGUAGCCUCCCAAUUG	1424
NM_001735.2_2283-2301_s	2283-2301	GCUACACAUGAAGACCCUG	856	CAGGGUCUUCAUGUGUAGC	1425
NM_001735.2_2289-2307_s	2289-2307	CAUGAAGACCCUGUUACCA	857	UGGUAACAGGGUCUUCAUG	1426
NM_001735.2_2303-2321_s	2303-2321	UACCAGUAAGCAAGCCAGA	858	UCUGGCUUGCUUACUGGUA	1427
NM_001735.2_2311-2329_s	2311-2329	AGCAAGCCAGAAAUCGGA	859	UCCGAAUUCUGGCUUGCU	1428
NM_001735.2_2319-2337_s	2319-2337	AGAAAUCGAGUUUUUUU	860	AAAAUACUCCGAAUUUCU	1429
NM_001735.2_2329-2347_s	2329-2347	AGUUUUUUUCCAGAAAGCU	861	AGCUUUCUGGAAAAUACU	1430

NM_001735.2_2339-2357_s	2339-2357	CAGAAAGCUGGUUGGGGA	862	UCCCACAACCAGCUUUCUG	1431
NM_001735.2_2352-2370_s	2352-2370	GUGGGAAGUUCAUCUUGUU	863	AACAAGAUGAACUCCAC	1432
NM_001735.2_2361-2379_s	2361-2379	UCAUCUUGUCCCAGAAGA	864	UCUUCUGGGAACAAGAUGA	1433
NM_001735.2_2372-2390_s	2372-2390	CCAGAAGAAAACAGUUGCA	865	UGCAACUGUUUCUUCUGG	1434
NM_001735.2_2383-2401_s	2383-2401	CAGUUGCAGUUUGCCCUAC	866	GUAGGGCAAACUGCAACUG	1435
NM_001735.2_2389-2407_s	2389-2407	CAGUUUGCCCUACCGAUU	867	AAUCAGGUAGGGCAAACUG	1436
NM_001735.2_2401-2419_s	2401-2419	CCUGAUUCUCUAACCACCU	868	AGGUGGUUAGAGAAUCAGG	1437
NM_001735.2_2413-2431_s	2413-2431	ACCACCUGGGAAAUAACAG	869	CUUGAAUUUCCAGGUGGU	1438
NM_001735.2_2422-2440_s	2422-2440	GAAAUUCAAGGCGUUGGCA	870	UGCCAACGCCUUGAAUUUC	1439
NM_001735.2_2433-2451_s	2433-2451	CGUUGGCAUUUCAACACU	871	AGUGUUUGAAAUGCCAACG	1440
NM_001735.2_2439-2457_s	2439-2457	CAUUUCAAAACACUGGUUA	872	UAUACCAGUGUUUGAAAUG	1441
NM_001735.2_2453-2471_s	2453-2471	GUAUAUGUGUUGCUGAUAC	873	GUAUCAGCAACACAUUAC	1442
NM_001735.2_2463-2481_s	2463-2481	UGCUGAUACUGUCAAGGCA	874	UGCCUUGACAGUAUCAGCA	1443
NM_001735.2_2471-2489_s	2471-2489	CUGUCAAGGCAAAGGUGUU	875	AACACCUUUGCCUUGACAG	1444
NM_001735.2_2483-2501_s	2483-2501	AGGUGUUCAAAGAUGUCUU	876	AAGACAUCUUUGAACACCU	1445
NM_001735.2_2490-2508_s	2490-2508	CAAAGAUGUCUCCUGGAA	877	UCCAGGAAGACAUCUUUG	1446
NM_001735.2_2499-2517_s	2499-2517	CUUCCUGGAAAUGAAUAUA	878	UAUAUUAUUUCCAGGAAG	1447
NM_001735.2_2511-2529_s	2511-2529	GAAUAUACCAUAUUCUGUU	879	AACAGAAUUGGUUAUUAUC	1448
NM_001735.2_2520-2538_s	2520-2538	AUAUUCUGUUGUACGAGGA	880	UCCUCGUACAACAGAAUAU	1449
NM_001735.2_2533-2551_s	2533-2551	CGAGGAGAACAGAUCCAUA	881	AUUGGAUCUGUUCUCCCG	1450
NM_001735.2_2539-2557_s	2539-2557	GAACAGAUCCAUAUGAAAG	882	CUUUCAAUUGGAUCUGUUC	1451
NM_001735.2_2553-2571_s	2553-2571	GAAAGGAACUGUUUACAAC	883	GUUGUAAACAGUCCUUUC	1452
NM_001735.2_2560-2578_s	2560-2578	ACUGUUUACAACUAUAGGA	884	UCCUAUAGUUGUAAAACAGU	1453
NM_001735.2_2569-2587_s	2569-2587	AACUAUAGGACUUCUGGGA	885	UCCCAGAAGUCCUAUAGUU	1454

NM_001735.2_2583-2601_s	2583-2601	UGGGAUGCAGUUCUGUGUU	886	AACACAGAACUGCAUCCCA	1455
NM_001735.2_2592-2610_s	2592-2610	GUUCUGUGUUAAAUGUCU	887	AGACAUUUU AACACAGAAC	1456
NM_001735.2_2600-2618_s	2600-2618	UUAAAAUGUCUGCUGUGGA	888	UCCACAGCAGACAUUUUAA	1457
NM_001735.2_2612-2630_s	2612-2630	CUGUGGAGGGAAUCUGCAC	889	GUGCAGAUUCCCUCCACAG	1458
NM_001735.2_2620-2638_s	2620-2638	GGAAUCUGCACUUCGGAAA	890	UUUCCGAAGUGCAGAUUCC	1459
NM_001735.2_2633-2651_s	2633-2651	CGGAAAGCCCAGUCAUUGA	891	UCA AUGACUGGGCUUCCG	1460
NM_001735.2_2641-2659_s	2641-2659	CCAGUCAUUGAUCAUCAGG	892	CCUGAUGAUCAAUGACUGG	1461
NM_001735.2_2653-2671_s	2653-2671	CAUCAGGGCACAAGUCCU	893	AGGACUUUGUGCCCUGAUG	1462
NM_001735.2_2659-2677_s	2659-2677	GGCACAAGUCCUCCAAAU	894	AUUUGGAGGACUUUGUGCC	1463
NM_001735.2_2673-2691_s	2673-2691	CAAAUGUGUGCGCCAGAAA	895	UUUCUGGCGCACACAUUUG	1464
NM_001735.2_2682-2700_s	2682-2700	GCGCCAGAAAGUAGAGGGC	896	GCCCUCUACUUUCUGGCGC	1465
NM_001735.2_2691-2709_s	2691-2709	AGUAGAGGGCUCCUCCAGU	897	ACUGGAGGAGCCCUCUACU	1466
NM_001735.2_2702-2720_s	2702-2720	CCUCCAGUCACUUGGUGAC	898	GUCACCAAGUGACUGGAGG	1467
NM_001735.2_2709-2727_s	2709-2727	UCACUUGGUGACAUUCACU	899	AGUGAAUGACACCAAGUGA	1468
NM_001735.2_2720-2738_s	2720-2738	CAUUCACUGUGCUUCCUCU	900	AGAGGAAGCACAGUGAAUG	1469
NM_001735.2_2739-2757_s	2739-2757	GGAAAUUGGCCUUCACAAC	901	GUUGUGAAGGCCAAUUUCC	1470
NM_001735.2_2749-2767_s	2749-2767	CUUCACAACAUCAAUUUUU	902	AAAAAUUGAUGUUGUGAAG	1471
NM_001735.2_2761-2779_s	2761-2779	AAUUUUUCACUGGAGACUU	903	AAGUCUCCAGUGAAAAAUU	1472
NM_001735.2_2770-2788_s	2770-2788	CUGGAGACUUGGUUUGGAA	904	UUCCAAACCAAGUCUCCAG	1473
NM_001735.2_2780-2798_s	2780-2798	GGUUUGGAAAAGAAAUCUU	905	AAGAUUUCUUUCCAAACC	1474
NM_001735.2_2793-2811_s	2793-2811	AAUCUUAGUAAAAACAUUA	906	UAAUGUUUUUACUAAGAUU	1475
NM_001735.2_2802-2820_s	2802-2820	AAAAACAUUACGAGUGGUG	907	CACCACUCGUA AUGUUUUU	1476
NM_001735.2_2813-2831_s	2813-2831	GAGUGGUGCCAGAAGGUGU	908	ACACCUUCUGGCACCACUC	1477
NM_001735.2_2823-2841_s	2823-2841	AGAAGGUGUCAAAAAGGGAA	909	UUCCUUUUGACACCUUCU	1478

NM_001735.2_2829-2847_s	2829-2847	UGUCAAAAGGAAAGCUAU	910	AUAGCUUCCUUUUGACA	1479
NM_001735.2_2843-2861_s	2843-2861	GCUAUUCUGGUGUUACUUU	911	AAAGUACACCAGAAUAGC	1480
NM_001735.2_2852-2870_s	2852-2870	GUGUUACUUUGGAUCCUAG	912	CUAGGAUCCAAAGUAACAC	1481
NM_001735.2_2862-2880_s	2862-2880	GGAUCCUAGGGGUUUUUU	913	AUAAAUACCCCUAGGAUCC	1482
NM_001735.2_2872-2890_s	2872-2890	GGUAUUUAUGGUACCAUUA	914	UAAUGGUACCAUAAAUACC	1483
NM_001735.2_2882-2900_s	2882-2900	GUACCAUUAGCAGACGAAA	915	UUUCGUCUGCUAAUGGUAC	1484
NM_001735.2_2892-2910_s	2892-2910	CAGACGAAAGGAGUCCCA	916	UGGGAACUCCUUUCGUCUG	1485
NM_001735.2_2900-2918_s	2900-2918	AGGAGUCCCAUACAGGAU	917	AUCCUGUAUGGGAACUCCU	1486
NM_001735.2_2909-2927_s	2909-2927	CAUACAGGAUACCCUUAGA	918	UCUAAGGGUAUCCUGUAUG	1487
NM_001735.2_2922-2940_s	2922-2940	CUUAGAUUUGGUCCCAAA	919	UUUGGGACCAAUCUAAG	1488
NM_001735.2_2933-2951_s	2933-2951	UCCCCAAAACAGAAUCAA	920	UUGAUUUCUGUUUUGGGGA	1489
NM_001735.2_2941-2959_s	2941-2959	ACAGAAAUCAAAGGAUUU	921	AAAUCCUUUUGAUUUCUGU	1490
NM_001735.2_2951-2969_s	2951-2969	AAAGGAUUUUGAGUGUAAA	922	UUUACACUCAAAAUCCUUU	1491
NM_001735.2_2962-2980_s	2962-2980	AGUGUAAAAGGACUGCUUG	923	CAAGCAGUCCUUUACACU	1492
NM_001735.2_2969-2987_s	2969-2987	AAGGACUGCUUGUAGGUGA	924	UCACCUACAAGCAGUCCUU	1493
NM_001735.2_2980-2998_s	2980-2998	GUAGGUGAGAUUCUGUCUG	925	CAGACAAGAUCUCACCUAC	1494
NM_001735.2_2989-3007_s	2989-3007	AUCUUGUCUGCAGUUCUAA	926	UUAGAACUGCAGACAAGAU	1495
NM_001735.2_3001-3019_s	3001-3019	GUUCUAAGUCAGGAAGGCA	927	UGCCUUCUGACUUAGAAC	1496
NM_001735.2_3013-3031_s	3013-3031	GAAGGCAUCAAUUCCUAA	928	UUAGGAUAUUGAUGCCUUC	1497
NM_001735.2_3020-3038_s	3020-3038	UCAAUUCCUAACCCACCU	929	AGGUGGGUUAGGAUAUUGA	1498
NM_001735.2_3033-3051_s	3033-3051	CCACCUCCCAAAGGGAGU	930	ACUCCUUUGGGGAGGUGG	1499
NM_001735.2_3039-3057_s	3039-3057	CCCCAAAGGGAGUGCAGAG	931	CUCUGCACUCCUUUGGGG	1500
NM_001735.2_3050-3068_s	3050-3068	GUGCAGAGCGGAGCUGAU	932	AUCAGCUCCGCCUCUGCAC	1501
NM_001735.2_3060-3078_s	3060-3078	GGAGCUGAUGAGCGUUGUC	933	GACAACGCUCAUCAGCUCC	1502

NM_001735.2_3072-3090_s	3072-3090	CGUUGUCCAGUAUUCUAU	934	AUAGAAUACUGGGACAACG	1503
NM_001735.2_3079-3097_s	3079-3097	CCAGUAUUCUAUGUUUUUC	935	GAAAAACAUAGAAUACUGG	1504
NM_001735.2_3091-3109_s	3091-3109	GUUUUUCACUACCUGGAAA	936	UUUCCAGGUAGUGAAAAAC	1505
NM_001735.2_3102-3120_s	3102-3120	CCUGGAAACAGGAAAUCAU	937	AUGAUUCCUGUUUCCAGG	1506
NM_001735.2_3122-3140_s	3122-3140	GGAACAUUUUUCAUUCUGA	938	UCAGAAUGAAAAUUGUCC	1507
NM_001735.2_3133-3151_s	3133-3151	CAUUCUGACCCAUUAAUUG	939	CAAUUAAUGGGUCAGAAUG	1508
NM_001735.2_3142-3160_s	3142-3160	CCAUUAAUUGAAAAGCAGA	940	UCUGCUUUUCAAUUAAUGG	1509
NM_001735.2_3153-3171_s	3153-3171	AAAGCAGAAACUGAAGAAA	941	UUUCUUCAGUUUCUGCUUU	1510
NM_001735.2_3161-3179_s	3161-3179	AACUGAAGAAAAUUUAAA	942	UUUAAUUUUUUCUUCAGUU	1511
NM_001735.2_3169-3187_s	3169-3187	AAAAAUUAAAAGAAGGGA	943	UCCCUUUUUUAAUUUUUUU	1512
NM_001735.2_3183-3201_s	3183-3201	AGGGAUGUGAGCAUUUUG	944	CAUAAUGCUCACAUCCCU	1513
NM_001735.2_3192-3210_s	3192-3210	GAGCAUUUUGUCCUACAGA	945	UCUGUAGGACAUAAUGCUC	1514
NM_001735.2_3200-3218_s	3200-3218	UGUCCUACAGAAAUGCUGA	946	UCAGCAUUUCUGUAGGACA	1515
NM_001735.2_3211-3229_s	3211-3229	AAUGCUGACUACUCUUACA	947	UGUAAGAGUAGUCAGCAUU	1516
NM_001735.2_3220-3238_s	3220-3238	UACUCUACAGUGUGUGGA	948	UCCACACACUGUAAGAGUA	1517
NM_001735.2_3229-3247_s	3229-3247	AGUGUGUGGAAGGGUGGAA	949	UCCACCCUCCACACACU	1518
NM_001735.2_3240-3258_s	3240-3258	GGGUGGAAGUGCUAGCACU	950	AGUGCUAGCACUCCACCC	1519
NM_001735.2_3250-3268_s	3250-3268	GCUAGCACUUGGUUAAACAG	951	CUGUUAACCAAGUGCUAGC	1520
NM_001735.2_3260-3278_s	3260-3278	GGUUAACAGCUUUUGCUUU	952	AAAGCAAAGCUGUUAACC	1521
NM_001735.2_3273-3291_s	3273-3291	UGCUUUAAGAGUACUUGGA	953	UCCAAGUACUCUUAAGCA	1522
NM_001735.2_3283-3301_s	3283-3301	GUACUUGGACAAGUAAAUA	954	UAUUUACUUGUCCAAGUAC	1523
NM_001735.2_3292-3310_s	3292-3317	CAAGUAAAUAUUACGUAG	955	CUACGUUUUUAUUUACUUG	1524
NM_001735.2_3299-3317_s	3299-3317	AUAAAUACGUAGAGCAGAA	956	UUCUGCUCUACGUUUUUU	1525
NM_001735.2_3310-3328_s	3310-3328	GAGCAGAACCAAAUUCAA	957	UUGAAUUUUGGUUCUGCUC	1526

NM_001735.2_3322-3340_s	3322-3340	AAUUCAAUUUGUAAUUCUU	958	AAGAAUUACAAAUGAAUU	1527
NM_001735.2_3332-3350_s	3332-3350	GUAAUUCUUUAUUGUGGCU	959	AGCCACAUAAGAAUUAC	1528
NM_001735.2_3342-3360_s	3342-3360	AUUGUGGCUAGUUGAGAAU	960	AUUCUCAACUAGCCACAAU	1529
NM_001735.2_3349-3367_s	3349-3367	CUAGUUGAGAAUUAUCAAU	961	AUUGUAUUUCUCAACUAG	1530
NM_001735.2_3360-3378_s	3360-3378	UUUAUCAUUAGAUAAUGGA	962	UCCAUAUUCUAAUUGAUAA	1531
NM_001735.2_3373-3391_s	3373-3391	AAUGGAUCUUUCAAGGAAA	963	UUUCCUUGAAAGAUCCAUU	1532
NM_001735.2_3380-3398_s	3380-3398	CUUUCAAGGAAAUAUCACA	964	UGUGAAUUUCCUUGAAAG	1533
NM_001735.2_3391-3409_s	3391-3409	AAUUCACAGUAUCAACCAA	965	UUGGUUGAUACUGUGAAUU	1534
NM_001735.2_3399-3417_s	3399-3417	GUUAUCAACCAUAAAAUUA	966	UAAUUUUUAUUGGUUGAUAC	1535
NM_001735.2_3411-3429_s	3411-3429	AAAAUUACAGGGUACCUUG	967	CAAGGUACCCUGUAAUUUU	1536
NM_001735.2_3419-3437_s	3419-3437	AGGGUACCUUGCCUGUUGA	968	UCAACAGGCAAGGUACCCU	1537
NM_001735.2_3433-3451_s	3433-3451	GUUGAAGCCCAGAGAACA	969	UGUUCUCUCGGGCUUCAAC	1538
NM_001735.2_3441-3459_s	3441-3559	CCGAGAGAACAGCUUAUUAU	970	AUAUAAGCUGUUCUCUCGG	1539
NM_001735.2_3452-3470_s	3452-3470	GCUUAUAUCUUCAGCCUU	971	AAGGCUGUAAGAUUAAGC	1540
NM_001735.2_3460-3478_s	3460-3478	CUUACAGCCUUUACUGUGA	972	UCACAGUAAAGGCUGUAAG	1541
NM_001735.2_3482-3500_s	3482-3500	GAAUUAGAAAGGCUUUCGA	973	UCGAAAGCCUUCUAAUUC	1542
NM_001735.2_3492-3510_s	3492-3510	GGCUUUCGAUUAUGCCCC	974	GGGGCAUUAUCGAAAGCC	1543
NM_001735.2_3499-3517_s	3499-3517	GAUAUUAUGCCCCUGGUGA	975	UCACCAGGGGCAUUAUUC	1544
NM_001735.2_3513-3531_s	3513-3531	GGUGAAAUCGACACAGCU	976	AGCUGUGUCGAUUUUCACC	1545
NM_001735.2_3522-3540_s	3522-3540	CGACACAGCUCUAAUUAAA	977	UUUAAUUAGAGCUGUGUCG	1546
NM_001735.2_3529-3547_s	3529-3547	GCUCUAAUUAAGCUGACA	978	UGUCAGCUUUAUUAGAGC	1547
NM_001735.2_3542-3560_s	3542-3560	CUGACAACUUUCUGCUUGA	979	UCAAGCAGAAAGUUGUCAG	1548
NM_001735.2_3549-3567_s	3549-3567	CUUUCUGCUUGAAAAUACA	980	UGUAUUUUAAGCAGAAAG	1549
NM_001735.2_3560-3578_s	3560-3578	AAAAUACACUGCCAGCCCA	981	UGGGCUGGCAGUGUAAUUU	1550

NM_001735.2_3573-3591_s	3573-3591	AGCCCAGAGCACCUUUACA	982	UGUAAAAGGUGCUCUGGGCU	1551
NM_001735.2_3581-3599_s	3581-3599	GCACCUUUACAUUGGCCAU	983	AUGGCCAAUGUAAAAGGUGC	1552
NM_001735.2_3589-3607_s	3589-3607	ACAUUGGCCAUUUCUGCGU	984	ACGCAGAAAUGGCCAAUGU	1553
NM_001735.2_3602-3620_s	3602-3620	CUGCGUAUGCUCUUUCCCU	985	AGGGAAAAGAGCAUACGCAG	1554
NM_001735.2_3613-3631_s	3613-3631	CUUUCCCUGGGAGAUAAAA	986	UUUUAUCUCCCAGGGAAAAG	1555
NM_001735.2_3623-3641_s	3623-3641	GAGAUAAAACUCACCCACA	987	UGUGGGUGAGUUUUUUCUC	1556
NM_001735.2_3631-3649_s	3631-3649	ACUCACCCACAGUUUCGUU	988	AACGAAACUGUGGGUGAGU	1557
NM_001735.2_3640-3658_s	3640-3658	CAGUUUCGUUCAAUUGUUU	989	AAACAAUUGAACGAAACUG	1558
NM_001735.2_3650-3668_s	3650-3668	CAAUUGUUUCAGCUUUGAA	990	UUCAAAGCUGAAACAAUUG	1559
NM_001735.2_3662-3680_s	3662-3680	CUUUGAAGAGAGAAGCUUU	991	AAAGCUUCUCUCUUCAAAAG	1560
NM_001735.2_3669-3687_s	3669-3687	GAGAGAAGCUUUGGUUAAA	992	UUUAACCAAAGCUUCUCUC	1561
NM_001735.2_3682-3700_s	3682-3700	GUUAAAGGUAAUCCACCCA	993	UGGGUGGAUUACCUUUAAC	1562
NM_001735.2_3691-3709_s	3691-3709	AAUCCACCCAUUUUUCGUU	994	AACGAUAAAUGGGUGGAUU	1563
NM_001735.2_3699-3717_s	3699-3717	CAUUUAUCGUUUUUGGAAA	995	UUUCCAAAAACGAUAAAUG	1564
NM_001735.2_3710-3728_s	3710-3728	UUUGGAAAGACAUCUUCA	996	UGAAGAUUGUCUUUCCAAA	1565
NM_001735.2_3721-3739_s	3721-3739	AAUCUUCAGCAUAAAGACA	997	UGUCUUUAUGCUGAAGAUU	1566
NM_001735.2_3730-3748_s	3730-3748	CAUAAAGACAGCUCUGUAC	998	GUACAGAGCUGUCUUUAUG	1567
NM_001735.2_3741-3759_s	3741-3759	CUCUGUACCUAACACUGGU	999	ACCAGUGUUAGGUACAGAG	1568
NM_001735.2_3752-3770_s	3752-3770	ACACUGGUACGGCACGUAU	1000	AUACGUGCCGUACCAGUGU	1569
NM_001735.2_3762-3780_s	3762-3780	GGCACGUAUGGUAGAAACA	1001	UGUUUCUACCAUACGUGCC	1570
NM_001735.2_3771-3789_s	3771-3789	GGUAGAAACAACUGCCUUAU	1002	AUAGGCAGUUGUUUCUACC	1571
NM_001735.2_3779-3797_s	3779-3797	CAACUGCCUAUGCUUUACU	1003	AGUAAAGCAUAGGCAGUUG	1572
NM_001735.2_3791-3809_s	3791-3809	CUUUACUCACCAGUCUGAA	1004	UUCAGACUGGUGAGUAAAAG	1573
NM_001735.2_3803-3821_s	3803-3821	GUCUGAACUUGAAAGAUAU	1005	AUAUCUUUCAAGUUCAGAC	1574

NM_001735.2_3809-3827_s	3809-3827	ACUUGAAAGAUUAAAUA	1006	UAAUUUAUAUCUUUCAAGU	1575
NM_001735.2_3819-3837_s	3819-3837	UAUAAAUAUGUUAACCCA	1007	UGGGUUAACAUAUUUAUA	1576
NM_001735.2_3829-3847_s	3829-3847	GUUAACCCAGUCAUCAAU	1008	AUUUGAUGACUGGGUUAAC	1577
NM_001735.2_3839-3857_s	3839-3857	UCAUCAAAUGGCUAUCAGA	1009	UCUGAUAGCCAUUUGAUGA	1578
NM_001735.2_3851-3869_s	3851-3869	UAUCAGAAGAGCAGAGGUA	1010	UACCCUGCUCUUCUGAUA	1579
NM_001735.2_3863-3881_s	3863-3881	AGAGGUUAUGGAGGUGCUU	1011	AAGCCACCUCAUACCUCU	1580
NM_001735.2_3872-3890_s	3872-3890	GAGGUGGCUUUUAUCAAC	1012	GUUGAAUAAAAGCCACCUC	1581
NM_001735.2_3883-3901_s	3883-3901	UAUUCAACCCAGGACACAA	1013	UUGUGUCCUGGGUUGAAUA	1582
NM_001735.2_3893-3911_s	3893-3911	AGGACACAUAUAGCCAU	1014	AUGGCAUUGAUUGUGUCCU	1583
NM_001735.2_3899-3917_s	3899-3917	CAAUCAAUGCCAUGAGGG	1015	CCCUCAAUGGCAUUGAUUG	1584
NM_001735.2_3909-3927_s	3909-3927	CAUUGAGGGCCUGACGGAA	1016	UUCGGUCAGGCCUCAUUG	1585
NM_001735.2_3922-3940_s	3922-3940	ACGGAAUAUUCACUCCUGG	1017	CCAGGAGUGAAUAUCCGU	1586
NM_001735.2_3930-3948_s	3930-3948	UUCACUCCUGGUAAAACAA	1018	UUGUUUAACCAGGAGUGAA	1587
NM_001735.2_3939-3957_s	3939-3957	GGUUAACAACUCCGCUUG	1019	CAAGCGGAGUUGUUUAACC	1588
NM_001735.2_3951-3969_s	3951-3969	CCGCUUGAGUAUGGACAUC	1020	GAUGUCCAUAUCUAAGCGG	1589
NM_001735.2_3963-3981_s	3963-3981	GGACAUCGAUGUUUCUAC	1021	GUAAGAAACAUCGAUGUCC	1590
NM_001735.2_3969-3987_s	3969-3987	CGAUGUUUCUACAAGCAU	1022	AUGCUUGUAAGAAACAUCG	1591
NM_001735.2_3981-3999_s	3981-3999	CAAGCAUAAAGGUGCCUUA	1023	UAAGGCACCUUUUUGCUUG	1592
NM_001735.2_3992-4010_s	3992-4010	GUGCCUUAUAUUUAUA	1024	UUUAUUUAUGUAAGGCAC	1593
NM_001735.2_3999-4017_s	3999-4017	ACAUAUUUAUUAAAUGACA	1025	UGUCAUUUUUAUUUAUGU	1594
NM_001735.2_4009-4027_s	4009-4027	AAAUGACAGACAAGAAU	1026	AAUUCUUGUCUGUCAUUU	1595
NM_001735.2_4020-4038_s	4020-4038	CAAGAAUUCCUUGGGAGG	1027	CCUCCAAGGAAUUCUUG	1596
NM_001735.2_4029-4047_s	4029-4047	CCUUGGGAGGCCAGUAGAG	1028	CUCUACUGGCCUCCAAGG	1597
NM_001735.2_4041-4059_s	4041-4059	AGUAGAGGUGCUUCUCAAU	1029	AUUGAGAAGCACCUCUACU	1598

044245

NM_001735.2_4051-4069_s	4051-4069	CUUCUCAUUGAUGACCUCA	1030	UGAGGUCAUCAUUGAGAAG	1599
NM_001735.2_4062-4080_s	4062-4080	UGACCUCAUUGUCAGUACA	1031	UGUACUGACAAUGAGGUCA	1600
NM_001735.2_4072-4090_s	4072-4090	GUCAGUACAGGAUUUGGCA	1032	UGCCAAAUCCUGUACUGAC	1601
NM_001735.2_4080-4098_s	4080-4098	AGGAUUUGGCAGUGGCUUG	1033	CAAGCCACUGCCAAAUCU	1602
NM_001735.2_4092-4110_s	4092-4110	UGGCUUGGCUACAGUACAU	1034	AUGUACUGUAGCCAAGCCA	1603
NM_001735.2_4099-4117_s	4099-4117	GCUACAGUACAUGUAACAA	1035	UUGUUACAUGUACUGUAGC	1604
NM_001735.2_4113-4131_s	4113-4131	AACAACUGUAGUUCACAAA	1036	UUUGUGAACUACAGUUGUU	1605
NM_001735.2_4120-4138_s	4120-4138	GUAGUUCACAAAACCAGUA	1037	UACUGUUUUUGUGAACUAC	1606
NM_001735.2_4130-4148_s	4130-4148	AAACCAGUACCUCUGAGGA	1038	UCCUCAGAGGUACUGUUU	1607
NM_001735.2_4143-4161_s	4143-4161	UGAGGAAGUUUGCAGCUUU	1039	AAAGCUGCAAACUCCUCA	1608
NM_001735.2_4153-4171_s	4153-4171	UGCAGCUUUUAUUUGAAAA	1040	UUUUCAAUAAAAGCUGCA	1609
NM_001735.2_4163-4181_s	4163-4181	AUUUGAAAAUCGAUACUCA	1041	UGAGUAUCGAUUUCAAU	1610
NM_001735.2_4173-4191_s	4173-4191	CGAUACUCAGGAUUAUGAA	1042	UUCAAUAUCCUGAGUAUCG	1611
NM_001735.2_4182-4200_s	4182-4200	GGAUUAUGAAGCAUCCAC	1043	GUGGGAUGCUUCAUUAUCC	1612
NM_001735.2_4189-4207_s	4189-4207	GAAGCAUCCACUACAGAG	1044	CUCUGUAGUGGGAUGCUUC	1613
NM_001735.2_4199-4217_s	4199-4217	ACUACAGAGGCUACGGAAA	1045	UUUCCGUAGCCUCUGUAGU	1614
NM_001735.2_4212-4230_s	4212-4230	CGGAAACUCUGAUUACAAA	1046	UUUGUAAUCAGAGUUCCG	1615
NM_001735.2_4221-4239_s	4221-4239	UGAUUACAAACGCAUAGUA	1047	UACUAUGCGUUUGUAAUCA	1616
NM_001735.2_4232-4250_s	4232-4250	GCAUAGUAGCAUGUGCCAG	1048	CUGGCACAUGCUACUAUGC	1617
NM_001735.2_4240-4258_s	4240-4258	GCAUGUGCCAGCUACAAGC	1049	GCUUGUAGCUGGCACAUGC	1618
NM_001735.2_4251-4269_s	4251-4269	CUACAAGCCCAGCAGGGAA	1050	UUCCUGCUGGGCUUGUAG	1619
NM_001735.2_4260-4278_s	4260-4278	CAGCAGGAAGAAUCAUCA	1051	UGAUGAUUCUCCUGCUG	1620
NM_001735.2_4270-4288_s	4270-4288	GAAUCAUCAUCUGGAUCCU	1052	AGGAUCCAGAUGAUGAUUC	1621
NM_001735.2_4283-4301_s	4283-4301	GAUCCUCUAUGCGGUGAU	1053	AUCACCGCAUGAGAGGAUC	1622

NM_001735.2_4289-4307_s	4289-4307	CUCAUGCGGUGAUGGACAU	1054	AUGUCCAUCACCGCAUGAG	1623
NM_001735.2_4299-4317_s	4299-4317	GAUGGACAUCUCCUUGCCU	1055	AGGCAAGGAGAUGUCCAUC	1624
NM_001735.2_4311-4329_s	4311-4329	CUUGCCUACUGGAAUCAGU	1056	ACUGAUUCCAGUAGGCAAG	1625
NM_001735.2_4322-4340_s	4322-4340	GAAUCAGUGCAAUGAAGA	1057	UCUUCAUUUGCACUGAUUC	1626
NM_001735.2_4332-4350_s	4332-4350	AAAUGAAGAAGACUUAAAA	1058	UUUUAAGUCUUCUUAUUU	1627
NM_001735.2_4339-4357_s	4339-4357	GAAGACUUAAAAGCCUUG	1059	CAAGGGCUUUUAAGUCUUC	1628
NM_001735.2_4353-4371_s	4353-4371	CCUUGUGGAAGGGUGGAU	1060	AUCCACCCCUUCCACAAGG	1629
NM_001735.2_4360-4378_s	4360-4378	GAAGGGGUGGAUCAACUUAU	1061	AUAGUUGAUCCACCCUUC	1630
NM_001735.2_4370-4388_s	4370-4388	AUCAACUAUUCACUGAUUA	1062	UAAUCAGUGAAUAGUUGAU	1631
NM_001735.2_4380-4398_s	4380-4398	CACUGAUUACCAAUCAA	1063	UUUGAUUUGGUAUUCAGUG	1632
NM_001735.2_4393-4411_s	4393-4411	AUCAAGAUGGACAUGUUA	1064	UAACAUGUCCAUCUUUGAU	1633
NM_001735.2_4402-4420_s	4402-4420	GGACAUGUUAUUCUGCAAC	1065	GUUGCAGAAUACAUGUCC	1634
NM_001735.2_4413-4431_s	4413-4431	UCUGCAACUGAAUUCGAUU	1066	AAUCGAAUUCAGUUGCAGA	1635
NM_001735.2_4422-4440_s	4422-4440	GAAUUCGUAUCCUCCAGU	1067	ACUGGAGGGAAUCGAAUUC	1636
NM_001735.2_4432-4450_s	4432-4450	CCCUCCAGUAUUCCUUU	1068	AAAGGAAUUCACUGGAGGG	1637
NM_001735.2_4441-4459_s	4441-4459	GAUUUCCUUUGUGUACGAU	1069	AUCGUACACAAGGAAUUC	1638
NM_001735.2_4453-4471_s	4453-4471	GUACGAUUCGGAUUUUG	1070	CAAUAUCCGGAUUCGUAC	1639
NM_001735.2_4462-4480_s	4462-4480	CGGAUUAUUGAACUCUUUG	1071	CAAAGAUUCAAUAUCCG	1640
NM_001735.2_4473-4491_s	4473-4491	ACUCUUUGAAGUUGGGUUU	1072	AAACCAACUCAAAGAGU	1641
NM_001735.2_4482-4500_s	4482-4500	AGUUGGGUUUCUCAGUCCU	1073	AGGACUGAGAAACCAACU	1642
NM_001735.2_4490-4508_s	4490-4508	UUCUCAGUCCUGCCACUUU	1074	AAAGUGGCAGGACUGAGAA	1643
NM_001735.2_4503-4521_s	4503-4521	CACUUUCACAGUGUACGAA	1075	UUCGUACACUGUGAAAGUG	1644
NM_001735.2_4509-4527_s	4509-4527	CACAGUGUACGAAUACCAC	1076	GUGGUAUUCGUACACUGUG	1645
NM_001735.2_4523-4541_s	4523-4541	ACCACAGACCAGAUAAACA	1077	UGUUUAUCUGGUCUGUGGU	1646

NM_001735.2_4531-4549_s	4531-4549	CCAGAUAAACAGUGUACCA	1078	UGGUACACUGUUUAUCUGG	1647
NM_001735.2_4540-4558_s	4540-4558	CAGUGUACCAUGUUUUUAUA	1079	UAUAAAACAUGGUACACUG	1648
NM_001735.2_4551-4569_s	4551-4569	GUUUUAUAGCACUUCCAAU	1080	AUUGGAAGUGCUAUA AAAAC	1649
NM_001735.2_4562-4580_s	4562-4580	CUUCCAAUAUCAA AAUUCA	1081	UGAAUUUUGAU AUUGGAAG	1650
NM_001735.2_4570-4588_s	4570-4588	AUCAAAAUUCAGAAAGUCU	1082	AGACUUUCUGAAUUUUGAU	1651
NM_001735.2_4581-4599_s	4581-4599	GAAAGUCUGUGAAGGAGCC	1083	GGCUCUUCACAGACUUUC	1652
NM_001735.2_4591-4609_s	4591-4609	GAAGGAGCCGCGUGCAAGU	1084	ACUUGCACGCGGCCUCCUUC	1653
NM_001735.2_4601-4619_s	4601-4619	CGUGCAAGUGUGUAGAAGC	1085	GCUUCUACACACUUGCAGC	1654
NM_001735.2_4612-4630_s	4612-4630	GUAGAAGCUGAUUGUGGGC	1086	GCCCACAAUCAGCUUCUAC	1655
NM_001735.2_4619-4637_s	4619-4637	CUGAUUGUGGGCAAUGCA	1087	UGCAUUUGCCCACAAUCAG	1656
NM_001735.2_4629-4647_s	4629-4647	GCAAAUGCAGGAAGAAUUG	1088	CAAUUCUUCUGCAUUUGC	1657
NM_001735.2_4639-4657_s	4639-4657	GAAGAAUUGGAUCUGACAA	1089	UUGUCAGAUCCAAUUCUUC	1658
NM_001735.2_4651-4669_s	4651-4669	CUGACAAUCUCUGCAGAGA	1090	UCUCUGCAGAGAUUGUCAG	1659
NM_001735.2_4663-4681_s	4663-4681	GCAGAGACAAGAAAACAAA	1091	UUUGUUUUCUUGUCUCUGC	1660
NM_001735.2_4670-4688_s	4670-4688	CAAGAAAACAAACAGCAUG	1092	CAUGCUGUUUGUUUCUUG	1661
NM_001735.2_4681-4699_s	4681-4699	ACAGCAUGUAAACCAGAGA	1093	UCUCUGUUUACAUGCUGU	1662
NM_001735.2_4693-4711_s	4693-4711	CCAGAGAUUGCAUAUAGCUU	1094	AAGCAUUGCAAUCUCUGG	1663
NM_001735.2_4702-4720_s	4702-4720	GCAUAUGCUUAUAAAGUUA	1095	UAACUUUAUAGCAUAUGC	1664
NM_001735.2_4710-4728_s	4710-4728	UUUAAAAGUUAGCAUCACA	1096	UGUGAUGCUAACUUUAUAA	1665
NM_001735.2_4722-4740_s	4722-4740	CAUCACAUCCAUCACUGUA	1097	UACAGUGAUGGAUGUGAUG	1666
NM_001735.2_4733-4751_s	4733-4751	UCACUGUAGAAAUGUUUU	1098	AAAACAUUUUCUACAGUGA	1667
NM_001735.2_4740-4758_s	4740-4758	AGAAAAGUUUUUGUCAAG	1099	CUUGACAAAACAUUUUCU	1668
NM_001735.2_4750-4768_s	4750-4768	UUUGUCAAGUACAAGGCAA	1100	UUGCCUUGUACUUGACAAA	1669
NM_001735.2_4763-4781_s	4763-4781	AGGCAACCCUUCUGGAUUAU	1101	AUAUCCAGAAGGGUUGCCU	1670

NM_001735.2_4770-4788_s	4770-4788	CCUUCUGGAUAUCUACAAA	1102	UUUGUAGAUAUCCAGAAGG	1671
NM_001735.2_4779-4797_s	4779-4797	UAUCUACAAAACUGGGGAA	1103	UUCCCCAGUUUUGUAGAU	1672
NM_001735.2_4790-4808_s	4790-4808	CUGGGGAAGCUGUUGCUGA	1104	UCAGCAACAGCUUCCCCAG	1673
NM_001735.2_4799-4817_s	4799-4817	CUGUUGCUGAGAAAGACUC	1105	GAGUCUUUCUCAGCAACAG	1674
NM_001735.2_4813-4831_s	4813-4831	GACUCUGAGAUUACCUUCA	1106	UGAAGGUAUUCUCAGAGUC	1675
NM_001735.2_4819-4837_s	4819-4837	GAGAUUACCUUCAUUAAAA	1107	UUUUAAUGAAGGUAAUCUC	1676
NM_001735.2_4831-4849_s	4831-4849	AUUAAAAAGGUAACCUGUA	1108	UACAGGUUACCUUUUUAAU	1677
NM_001735.2_4841-4859_s	4841-4859	UAACCGUACUAACGCUGA	1109	UCAGCGUAGUACAGGUUA	1678
NM_001735.2_4850-4868_s	4850-4868	CUAACGCUGAGCUGUAAA	1110	UUUACCAGCUCAGCGUUAG	1679
NM_001735.2_4863-4881_s	4863-4881	GGUAAAAGGAAGACAGUAC	1111	GUACUGUCUCCUUUUUACC	1680
NM_001735.2_4871-4889_s	4871-4889	GAAGACAGUACUAAUUUAU	1112	AUAAUUAAAGUACUGUCUUC	1681
NM_001735.2_4881-4899_s	4881-4899	CUUAAUUUUGGGUAAAGAA	1113	UUCUUUACCCAUAAUUUAG	1682
NM_001735.2_4893-4911_s	4893-4911	UAAAGAAGCCCUCCAGUA	1114	UAUCUGGAGGGCUUCUUUA	1683
NM_001735.2_4902-4920_s	4902-4920	CCUCCAGAUAAAUAACAAU	1115	AUUGUAUUUUUUCUGGAGG	1684
NM_001735.2_4912-4930_s	4912-4930	AAAUACAAUUUCAGUUUCA	1116	UGAAACUGAAAUGUAAUUU	1685
NM_001735.2_4923-4941_s	4923-4941	CAGUUUCAGGUACAUCUAC	1117	GUAGAUGUACCUGAAACUG	1686
NM_001735.2_4931-4949_s	4931-4949	GGUACAUCUACCCUUUAGA	1118	UCUAAAGGUAGAUGUACC	1687
NM_001735.2_4942-4960_s	4942-4960	CCUUUAGAUCCUUGACCU	1119	AGGUCAAGGAAUCUAAAGG	1688
NM_001735.2_4952-4970_s	4952-4970	CCUUGACCUGGAUUGAAUA	1120	UAUUCAAUCCAGGUCAAGG	1689
NM_001735.2_4961-4979_s	4961-4979	GGAUUGAAUACUGGCCUAG	1121	CUAGGCCAGUAUCAAUCC	1690
NM_001735.2_4971-4989_s	4971-4989	CUGGCCUAGAGACACAACA	1122	UGUUGUGUCUCUAGGCCAG	1691
NM_001735.2_4979-4997_s	4979-4997	GAGACACAACAUUGUCAUC	1123	GAUGACAUGUUGUGUCUC	1692
NM_001735.2_4991-5009_s	4991-5009	GUUCAUCGUGUCAAGCAU	1124	AAUGCUUGACACGAUGAAC	1693
NM_001735.2_5000-5018_s	5000-5018	GUCAAGCAUUUUUAGCUAA	1125	UUAGCUAAAAUUCUUGAC	1694

NM_001735.2_5013-5031_s	5013-5031	AGCUAAUUUAGAUGAAUUU	1126	AAAUUCAUCUAAAUUAGCU	1695
NM_001735.2_5022-5040_s	5022-5040	AGAUGAAUUUGCCGAAGAU	1127	AUCUUCGGCAAUUUCAUCU	1696
NM_001735.2_5033-5051_s	5033-5051	CCGAAGAUAUCUUUUUAAA	1128	UUUAAAAAGAUUCUUCGG	1697
NM_001735.2_5043-5061_s	5043-5061	CUUUUUAAAUGGAUGCUGAA	1129	UUAGCAUCCAUUUAAAAAG	1698
NM_001735.2_5053-5071_s	5053-5071	GGAUGCIAAAAUCCUGAA	1130	UUCAGGAAUUUAGCAUCC	1699
NM_001735.2_5059-5077_s	5059-5077	UAAAAUCCUGAAGUUCAG	1131	CUGAACUUCAGGAAUUUUA	1700
NM_001735.2_5071-5089_s	5071-5089	AGUUCAGCUGCAUACAGUU	1132	AACUGUAUGCAGCUGAACU	1701
NM_001735.2_5080-5098_s	5080-5098	GCAUACAGUUUGCACUUAU	1133	AUAAGUGCAAACUGUAUGC	1702
NM_001735.2_5093-5111_s	5093-5111	ACUUAUGGACUCCUGUUGU	1134	ACAACAGGAGUCCAUAGU	1703
NM_001735.2_5099-5117_s	5099-5117	GGACUCCUGUUGUUGAAGU	1135	ACUUCAACAACAGGAGUCC	1704
NM_001735.2_5109-5127_s	5109-5127	UGUUGAAGUUCGUUUUUUU	1136	AAAAAACCGAACUCCAACA	1705
NM_001735.2_5122-5140_s	5122-5140	UUUUUUGUUUCUUCUUUU	1137	AAAAGAAGAAAACAAAAAA	1706
NM_001735.2_5132-5150_s	5132-5150	UCUUCUUUUUUAAAACAUU	1138	AAUGUUUAAAAAAGAAGA	1707
NM_001735.2_5139-5157_s	5139-5157	UUUUUAAACAUUCAUAGCU	1139	AGCUAUGAAUGUUUAAAAA	1708
NM_001735.2_5152-5170_s	5152-5170	AUAGCUGGUCUUUUUGUA	1140	UACAAAUAAGACCAGCUAU	1709
NM_001735.2_5159-5177_s	5159-5177	GUCUUUUUUGUAAAGCUCA	1141	UGAGCUUUACAAUAAGAC	1710
NM_001735.2_5170-5188_s	5170-5188	AAAGCUCACUUUACUUAGA	1142	UCUAAGUAAAGUGAGCUUU	1711
NM_001735.2_5182-5200_s	5182-5200	ACUUAGAAUUAGUGGCACU	1143	AGUGCCACUAAUUCUAAGU	1712
NM_001735.2_5192-5210_s	5192-5210	AGUGGCACUUGCUUUUUUU	1144	AAUAAAAGCAAGUGCCACU	1713
NM_001735.2_5202-5220_s	5202-5220	GCUUUUUUUAGAGAAUGAU	1145	AUCAUUCUCUAAUAAAAGC	1714
NM_001735.2_5212-5230_s	5212-5230	GAGAAUGAUUCAAUUGCU	1146	AGCAUUUGAAAUCAUUCUC	1715
NM_001735.2_5220-5238_s	5220-5238	UUUCAAAUGCUGUAACUUU	1147	AAAGUUACAGCAUUUGAAA	1716
NM_001735.2_5231-5249_s	5231-5249	GUAACUUUCUGAAAUAACA	1148	UGUUUUUCAGAAAAGUUAC	1717
NM_001735.2_5241-5259_s	5241-5259	GAAAUACAUGGCCUUGGA	1149	UCCAAGGCCAUGUUUUUUC	1718

NM_001735.2_5253-5271_s	5253-5271	CCUUGGAGGGCAUGAAGAC	1150	GUCUUCAUGCCCUCCAAGG	1719
NM_001735.2_5259-5277_s	5259-5277	AGGGCAUGAAGACAGAUAC	1151	GUAUCUGUCUUAUGCCCU	1720
NM_001735.2_5273-5291_s	5273-5291	GAUACUCCUCCAAGGUUUAU	1152	AUAACCUUGGAGGAGUAUC	1721
NM_001735.2_5279-5297_s	5279-5297	CCUCCAAGGUUAUUGGACA	1153	UGUCCAAUAACCUUGGAGG	1722
NM_001735.2_5293-5311_s	5293-5311	GGACACCGGAAACAAUAAA	1154	UUUAUUGUUUCCGGUGUCC	1723
NM_001735.2_5301-5319_s	5301-5319	GAAACAAUAAUUGGAACA	1155	UGUUCCAAUUUAUUGUUUC	1724
NM_001735.2_5311-5329_s	5311-5329	AUUGGAACACCUCCUAAA	1156	UUUGAGGAGGUGUCCAAU	1725
NM_001735.2_5322-5340_s	5322-5340	UCCUCAAAACCUACCACUCA	1157	UGAGUGGUAGGUUUGAGGA	1726
NM_001735.2_5331-5349_s	5331-5349	CUACCACUCAGGAAUGUUU	1158	AAACAUUCCUGAGUGGUAG	1727
NM_001735.2_5343-5361_s	5343-5361	AAUGUUUGCUGGGGCCGAA	1159	UUCGGCCCCAGCAAACAUU	1728
NM_001735.2_5349-5367_s	5349-5367	UGCUGGGGCCGAAAGAACA	1160	UGUUCUUUCGGCCCCAGCA	1729
NM_001735.2_5360-5378_s	5360-5378	AAAGAACAGUCCAUGAAA	1161	UUUCAAUGGACUGUUCUUU	1730
NM_001735.2_5371-5389_s	5371-5389	CAUUGAAAGGGAGUAUUAC	1162	GUAUACUCCCUUCAAUG	1731
NM_001735.2_5380-5398_s	5380-5398	GGAGUAUUACAAAACAUG	1163	CAUGUUUUUGUAUACUCC	1732
NM_001735.2_5391-5409_s	5391-5409	AAAACAUGGCCUUUGCUUG	1164	CAAGCAAAGGCCAUGUUUU	1733
NM_001735.2_5399-5417_s	5399-5417	GCCUUUGCUUGAAAGAAA	1165	UUUUCUUUCAAGCAAAGGC	1734
NM_001735.2_5409-5427_s	5409-5427	GAAAGAAAUAACCAAGGAA	1166	UUCCUUGGUUUUUUUUUUC	1735
NM_001735.2_5420-5438_s	5420-5438	CCAAGGAACAGGAAACUGA	1167	UCAGUUUCCUGUCCUUGG	1736
NM_001735.2_5433-5451_s	5433-5451	AACUGAUCAUUAAAGCCUG	1168	CAGGCUUUUAUGAUCAGUU	1737
NM_001735.2_5441-5459_s	5441-5459	AUUAAAGCCUGAGUUUGCU	1169	AGCAAACUCAGGCUUUAAU	1738

Пример 5. Сайленсинг C5 in vivo.

Группы из трех самок яванского макака обрабатывали C5-siRNA AD-58641 подкожно в лопаточную и среднюю часть спины в дозе 2,5 мг/кг или 5 мг/кг, или носителем в качестве контроля. Два круга применения осуществляли в восемь доз в каждом круге, каждый третий день. C5 в сыворотке собирали и оценивали с помощью анализа ELISA, специфическом для обнаружения C5 (Abscam) в указанные моменты времени (фиг. 13). Уровни C5 приводили к среднему из трех образцов до введения препарата. Образцы, собранные до введения препарата и на день 23 (через 24 ч после последней введенной дозы в первом круге лечения) подвергали биохимическому анализу сыворотки, гематологическому анализу и анализу на свертываемость.

Анализ уровня белка C5 в сыворотке по сравнению с уровнем белка C5 в сыворотке до лечения показал, что схема лечения с дозой 5 мг/кг AD-58641 привела к уменьшению уровня белка C5 в сыворотке до 98% (фиг. 12). Средние уровни C5 в сыворотке были снижены на 97% в нижней точке, что указывает, что большинство циркулирующего C5 происходит из печени. Наблюдали дозозависимый эффект и длительный "нокдаун" уровня белка C5 в сыворотке при подкожном введении AD-58641. Никаких изменений в параметрах гематологии, биохимии сыворотки или коагуляции не было определено через 24 ч после первого круга схемы применения.

Гемолитическую активность сыворотки также анализировали с применением анализа сенсibilизированных эритроцитов барана для измерения активности классического пути. Процентную долю гемоли-

за рассчитывали по отношению максимального гемолиза к фоновому гемолизу в контрольных образцах. Средний индекс гемолиза +/- SEM для трех животных рассчитывали и анализировали (фиг. 13). Гемолиз снизился до 94% в схеме лечения с дозой 5 мг/кг со средним значением ингибирования 92% в нижней точке. Снижение гемолиза поддерживалось в течение более чем двух недель после последней дозы.

Пример 6. Скрининг дополнительных siRNA *in vitro*.

Последовательности смысловой и антисмысловой цепей, представленные в табл. 20, модифицировали на 3'-конце короткой последовательностью дезокси-тимин нуклеотидов (dT) (табл. 21). Эффективность *in vitro* дуплексов, содержащих смысловую и антисмысловую последовательности, приведенные в табл. 21, определяли с помощью следующих способов.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Hep3В (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в EMEM (ATCC), дополненной 10% FBS (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 5 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. 40 мкл полных питательных сред, содержащих ~5×10³ клеток Hep3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ.

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

Выделение РНК проводили с применением полуавтоматического анализатора Biotek EL 405 washer. Вкратце, клетки лизировали в 75 мкл лизирующего/связывающего буфера, содержащего 2 мкл Dynabeads, затем смешивали в течение 10 мин при установке 7 электромагнитного шейкера (Union Scientific). Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 90 мкл промывочного буфера А, затем 90 мкл промывочного буфера В. Гранулы дважды промывали 100 мкл элюирующего буфера, который затем отсасывали и получали кДНК непосредственно на РНК, связанных с гранулами, в 384-луночном планшете.

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

Мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли непосредственно к РНК, связанных с гранулами, в 384-луночных планшетах, применяемых для выделения РНК. Затем планшеты встряхивали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин и затем помещали в инкубатор при 37°C в течение 2 ч. После этой инкубации планшеты помещали на шейкер в инкубаторе при 80°C в течение 7 мин для инактивации фермента и элюирования РНК/кДНК из гранул.

PCR в режиме реального времени.

2 мкл кДНК добавляли к смеси мастер-микса, содержащей 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, номер по каталогу 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для C5 (Applied Biosystems, номер по каталогу Hs00156197_M1) и 0,5 мкл зонда мастер-микс Lightcycler 480 (Roche, номер по каталогу 04887301001) в каждую лунку 384-луночного планшета (Roche, номер по каталогу 04887301001). PCR в режиме реального времени проводили в системе Roche LC480 Real Time PCR (Roche). Каждый дуплекс исследовали в по меньшей мере двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях.

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.

Табл. 22 показывает результаты теста разовой дозы в клетках Hep3В, трансфицированных указанными dT-модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

dT-модифицированные иРНК С5

ID дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Положение в NM_001735.2	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
AD-61779.2	UAUCCGUGGUUCCUGCUAdTdT	1739	3-21	UAGCAGGAAACCACGGAAUAdTdT	2306
AD-61785.2	GGUUUCCUGCUACCUCCAAdTdT	1740	10-28	UUGGAGGUAGCAGGAAACcdTdT	2307
AD-61791.2	CCUCCAACCAUGGGCCUUdTdT	1741	22-40	AAAGGCCCAUGGUUGGAGGdTdT	2308
AD-61797.2	GGGCCUUUGGGAAUACUdTdT	1742	33-51	AAGUAUCCCAAAAGGCCcdTdT	2309
AD-61803.2	GGAAUACUUUUUUUUAAAdTdT	1743	43-61	UUAAAAACAAGUAUUCcdTdT	2310
AD-61809.2	CUUUGUUUUUAAUCCUCCdTdT	1744	49-67	GGAAGAUUAAAAACAAGdTdT	2311
AD-61815.2	CUUCCUGGGGAAAACCGGdTdT	1745	63-81	CCAGGUUUUCCCAGGAAGdTdT	2312
AD-61821.2	GGAAAACCGGGGACAGAdTdT	1746	71-89	UCCUGUCCCAGGUUUUCCdTdT	2313
AD-61780.2	GGGACAGGAGCAACAUAUdTdT	1747	81-99	AUAUGUUUGCUCCUGUCCcdTdT	2314
AD-61786.2	CAACAUAUGUCAUUUCAGdTdT	1748	91-109	CUGAAAUGACAUAUGUUUGdTdT	2315
AD-61792.2	CAUUUCAGCACCAAAAUAAdTdT	1749	102-120	UAUUUUUGGUGCUGAAAUGdTdT	2316
AD-61798.2	GCACCAAAAUAUCCGUGcdTdT	1750	109-127	CACGGAUUUUUUUGGUGcdTdT	2317
AD-61804.2	CCGUGUUGGAGCAUCUGAAAdTdT	1751	123-141	UUCAGAUGCUCCAACACGGdTdT	2318
AD-61810.2	GGAGCAUCUGAAAAUAUUGdTdT	1752	130-148	CAAUUUUUCAGAUGCUCcdTdT	2319
AD-61816.2	GAAAAUAUUGUAUUCAGdTdT	1753	139-157	CUUGAAUCACAUAUUUUCdTdT	2320
AD-61822.2	GAUUCAAGUUUAUGGAUACdTdT	1754	150-168	GUAUCCAUAACUUGAAUcdTdT	2321
AD-61781.2	GGUAUCACUGAAGCAUUUGdTdT	1755	163-181	CAAAUGCUUCAGUUAUCCdTdT	2322
AD-61787.2	GAAGCAUUUGAUGCAACAAdTdT	1756	172-190	UUGUUGCAUCAAAGCUUCdTdT	2323
AD-61793.2	UGCAACAAUCUCUAUAAAAdTdT	1757	183-201	UUUAAUAGAGAUUGUUCAdTdT	2324
AD-61799.2	AAUCUCUAUAAAAGUUAUdTdT	1758	189-207	AUAACUUUAAAAGAGAUUdTdT	2325
AD-61805.2	AAGUUUCCUGAUAAAAAdTdT	1759	201-219	UUUUUUUUCAGGAUAUUdTdT	2326
AD-61811.2	CUGAUAAAAUUUAGUUAdTdT	1760	209-227	UAACUAAAUUUUUAUCAGdTdT	2327
AD-61817.2	JUAGUUACUCCUCAGGCCAdTdT	1761	221-239	UGGCCUCAGGAGUAACUAAdTdT	2328
AD-61823.2	CCUCAGGCCAUGUUCUUdTdT	1762	230-248	AAAUGAACUUGCCUGAGGdTdT	2329
AD-61782.2	JUCAUUUUCUCAGAGAAAdTdT	1763	242-260	UUCUCUGAGGAUAAUGAAAdTdT	2330
AD-61788.2	CUCAGAGAAUAAAUCCAAAdTdT	1764	252-270	UUGGAAUUUAUUCUCAGAdTdT	2331
AD-61794.2	AAUAAAUCCAAAACUCUGdTdT	1765	259-277	CAGAGUUUUGGAAUUUdTdT	2332
AD-61800.2	CUCUGCAAUCUAAACAUAAdTdT	1766	273-291	UAUUGUUAAAGAUUGCAGAdTdT	2333
AD-61806.2	CUUAACAUAACAACAAAAdTdT	1767	282-300	UUUUGGUUGUAUUGUUAAGdTdT	2334
AD-61812.2	CAACCAAAACAUAUGCCUGdTdT	1768	292-310	CAGGCAUUGUUUUGGUUGdTdT	2335
AD-61818.2	CAAUUGCCUGGAGACAAAAdTdT	1769	301-319	UUUGUCCUCCAGGCAUUGdTdT	2336
AD-61824.2	GGACAAAACCCAGUUUCUdTdT	1770	313-331	AAGAAACUGGGUUUUGUCCdTdT	2337
AD-61783.2	CCAGUUUCUUAUGUGUAUdTdT	1771	322-340	AAUACACUAAGAACUGGdTdT	2338
AD-61789.2	AUGUGUAUUUGGAAGUUGdTdT	1772	332-350	ACAACUCCAAAUAACAAdTdT	2339
AD-61795.2	GGAGUUGUAUCAAGCAUdTdT	1773	342-360	AUGCUUUGAUACAACUCCdTdT	2340
AD-61801.2	GUAUCAAAAGCAUUUCAAAdTdT	1774	349-367	UUGAAAAUGCUUUGAUACdTdT	2341
AD-61807.2	JUUUCAAAAUCAAAAAGAAAdTdT	1775	361-379	UUCUUUUGAUUUUGAAAAdTdT	2342
AD-61813.2	CAAAAAGAUGCCAAUAACdTdT	1776	371-389	GUUAUUGGCAUUCUUUUGdTdT	2343
AD-61819.2	GCCAAUAACCUAUGACAAUdTdT	1777	381-399	AUUGUCAUAGGUUAUUGGcdTdT	2344
AD-61825.2	CCUAUGACAAUGGAUUUCUdTdT	1778	389-407	AGAAAUCAUUGCAUAGGdTdT	2345

AD-61784.2	UGGAUUUCUCUUCUUAUCAdTdT	1779	399-417	AUGAAUGAAGAGAAUCCAdTdT	2346
AD-61790.2	CAUUCAUACAGACAAACCUdTdT	1780	411-429	AGGUUUUCUGUAUGAAUGdTdT	2347
AD-61796.2	CAGACAACCUGUUUAUACdTdT	1781	419-437	GUAUAAACAGGUUUUGUCUGdTdT	2348
AD-61802.2	SUUUAUACUCCAGACCAGUdTdT	1782	430-448	ACUGGUCUGGAGUAUAAACdTdT	2349
AD-61808.2	AGACCAGUCAGUAAAAGUUdTdT	1783	441-459	AACUUUUACUGACUGGUCUdTdT	2350
AD-61814.2	AGUAAAAGUUAGAGUUUAUdTdT	1784	450-468	AUAAACUCUAACUUUUACUdTdT	2351
AD-61820.2	AGAUUUUAUCGUUGAAUGdTdT	1785	460-478	CAUUCAACGAAUAAACUCUdTdT	2352
AD-61826.2	CGUUGAAGACGACUUGAAAdTdT	1786	470-488	UUCAAGUCGUAUUAACGdTdT	2353
AD-61832.2	CUUGAAGCCAGCCAAAAGAdTdT	1787	483-501	UCUUUUGGCUGGCUCAAGdTdT	2354
AD-61838.2	CCAGCCAAAAGAGAAACUGdTdT	1788	490-508	CAGUUUCUUUUUGGCUGGdTdT	2355
AD-61844.2	AAACUGUCUUAACUUCAUdTdT	1789	503-521	AUGAAAGUUAAAGACAGUUdTdT	2356
AD-61850.2	AACUUUCAUAGAUCUGAAAdTdT	1790	513-531	UUCAGGAUCUAUGAAAGUUdTdT	2357
AD-61856.2	CAUAGAUCUGAAGGAUCAdTdT	1791	519-537	UGAUCCUUCAGGAUCUAUGdTdT	2358
AD-61862.2	GAAGGAUCAGAAUGUACAdTdT	1792	529-547	UGUCAACUUCUGAUCCUUCdTdT	2359
AD-61868.2	UGACAUGGUAAGAAAUUdTdT	1793	543-561	AAUUUCUUCUACCAUGUCAdTdT	2360
AD-61872.2	GAAGAAAUGAUCAUUAUGdTdT	1794	553-571	CAUAUAGUAUAAUUUCUUCdTdT	2361
AD-61833.2	GAUCAUAUUGGAAUUAUCUdTdT	1795	562-580	AGAUAAUUCAAUAUGAUCdTdT	2362
AD-61839.2	GGAAUUAUCUUUUCCUGdTdT	1796	571-589	CAGGAAAAGAGUAUUAUCCdTdT	2363
AD-61845.2	CUCUUUCCUGACUUAAGdTdT	1797	579-597	CUUGAAGUCAGGAAAAGAGdTdT	2364
AD-61851.2	ACUUCAAGAUCCGUCUAAdTdT	1798	590-608	UUAGACGGAAUCUUGAUGdTdT	2365
AD-61857.2	CCGUCUAUCCUAGAUUAUGdTdT	1799	601-619	CAUAUCUAGGAUUAGACGGdTdT	2366
AD-61863.2	CCUAGAUUUGGUUUGGAdTdT	1800	610-628	UCCACAUCCAUAUCUAGGdTdT	2367
AD-61869.2	UGUGGACGAUCAAGGCUAAdTdT	1801	623-641	UUAGCCUUGAUCGUCCACAdTdT	2368
AD-61828.2	CGAUCAAGGCUAAAUAUAdTdT	1802	629-647	UUUAUUUAGCCUUGAUCGdTdT	2369
AD-61834.2	AUAUAAAGAGACUUUUCAdTdT	1803	642-660	UGAAAAGUCCUUUUUAUdTdT	2370
AD-61840.2	GAGGACUUUACAACUCGdTdT	1804	649-667	CAGUUGUUGAAAAGUCCUCdTdT	2371
AD-61846.2	CAACUGGAACCGCAUUAUUdTdT	1805	662-680	AAAUAUGCGGUCCAGUUGdTdT	2372
AD-61852.2	CGCAUUAUUUGAAGUUAAdTdT	1806	672-690	UUUAACUUCAAAUAUGCGdTdT	2373
AD-61858.2	AAGUUAAGAAUAUUGUCUdTdT	1807	683-701	AAGACAUUUCUUUAACUdTdT	2374
AD-61864.2	GAAUAUGUCUUGCCACAUCdTdT	1808	691-709	AAUGUGGCAAGACAUAUUCdTdT	2375
AD-61870.2	CCACAUUUUUCUGUCUAdTdT	1809	703-721	UUGAGACAGAAAAUUGGdTdT	2376
AD-61829.2	CUGUCUCAUCGAGCCAGAdTdT	1810	713-731	UCUGGCUCGAUUGAGACAGdTdT	2377
AD-61835.2	CAAUCGAGCCAGAAUUAAdTdT	1811	719-737	UUUAUUUCUGGCUCGAUUGdTdT	2378
AD-61841.2	GAAUAUAAUUCAUUGGUdTdT	1812	730-748	AACCAAUGAAAUAUUAUCdTdT	2379
AD-61847.2	AUUGGUACAAGAACUUAdTdT	1813	742-760	UAAAGUUCUUGUAACCAUdTdT	2380
AD-61853.2	AGAACUUUAAGAAUUUGAdTdT	1814	752-770	UCAAAAUCUUAAAGUUCUdTdT	2381
AD-61859.2	GAAUUUGAAAUAUUAUAdTdT	1815	762-780	UAUAGUAAUUUCAAUAUUCdTdT	2382
AD-61865.2	GAAAUAUCUAAAAGCAAdTdT	1816	769-787	UUGCUUUUAUGUAUUUUCdTdT	2383
AD-61871.2	AAAGCAAGAUUUUUUAUAdTdT	1817	781-799	UAUAAAAUAUCUUGCUUdTdT	2384
AD-61830.2	AUAUUUUUAUAAUAAAGUAdTdT	1818	789-807	UACUUUAUUAUAAAAUAUdTdT	2385
AD-61836.2	AAGUAGUCACUGAGGCUAdTdT	1819	803-821	UCAGCCUCAGUACUUCUdTdT	2386
AD-61842.2	CACUGAGGCUGACGUUAUdTdT	1820	810-828	AUAAACGUCAGCCUAGUGdTdT	2387
AD-61848.2	CGUUUAUUAUCAUUGGAdTdT	1821	822-840	UCCAAAUGUGUAUUAACGdTdT	2388
AD-61854.2	CACAUUUGGAAUAAGAGAdTdT	1822	831-849	UUCUCUUAUCCAAAUGUGdTdT	2389

AD-61860.2	AAUAAGAGAAGACUAAAAAdTdT	1823	840-858	UUUUAAGUCUUCUUAUUdTdT	2390
AD-61866.2	CUUAAAAGAUCAUAAAAAdTdT	1824	852-870	UUUUUGAUCUUCUUUAAGdTdT	2391
AD-61872.2	GAUGAUCAAAAAGAAUGAdTdT	1825	859-877	UCAUUUCUUUUUGAUCAdTdT	2392
AD-61831.2	AAAUGAUGCAAACAGCAAUdTdT	1826	872-890	AUUGCUGUUUGCAUCAUUdTdT	2393
AD-61837.2	ACAGCAAUGCAAAACACAAdTdT	1827	883-901	UUGUGUUUGCAUUGCUGdTdT	2394
AD-61843.2	AAAACACAUGUUGAUAAAdTdT	1828	893-911	UUUAUCAACAUGUGUUUUdTdT	2395
AD-61849.2	CAAUGUUGAUAAAUGAAUdTdT	1829	899-917	AUUCCAUUUAUCAAUUGdTdT	2396
AD-61855.2	GGAAUUGCUCAGUCACAdTdT	1830	913-931	AUGUGACUUGAGCAAUUCdTdT	2397
AD-61861.2	GCUCAAGUCACAUUGAUdTdT	1831	919-937	AAUCAAAUGUGACUUGAGCdTdT	2398
AD-61867.2	AUUUGAUUCUGAAACAGAdTdT	1832	930-948	UGCUGUUUCAGAAUCAAUdTdT	2399
AD-62062.1	UGAAACAGCAGUCAAGAAAdTdT	1833	939-957	UUCUUUGACUGCUGUUUCAdTdT	2400
AD-62068.1	CAAAGAACUGUCAUACUAdTdT	1834	951-969	GUAGUAUGACAGUUCUUUGdTdT	2401
AD-62074.1	CAUACUACAGUUUAGAAGAdTdT	1835	962-980	UCUUCUAAACUGUAGUUGdTdT	2402
AD-62080.1	CAGUUUAGAAGAUUUAAAdTdT	1836	969-987	GUUUAAAUCUUCUAAACUGdTdT	2403
AD-62086.1	UAAACAACAAGUACCUUUAdTdT	1837	983-1001	UAAAGGUACUUGUUGUUAdTdT	2404
AD-62092.1	CAAGUACCUUUUAUUGCUdTdT	1838	990-1008	AGCAAUUAAGGUACUUGdTdT	2405
AD-62098.1	UAUUGCUGUAACAGUCAUAdTdT	1839	1002-1020	UAUGACUGUUACAGCAAUAdTdT	2406
AD-62104.1	AACAGUCAUAGAGUCUACAdTdT	1840	1011-1029	UGUAGACUCUAGACUGUUdTdT	2407
AD-62063.1	AGAGUCUACAGGUGGAUUdTdT	1841	1020-1038	AAAUCCACUGUAGACUCUdTdT	2408
AD-62069.1	GGAUUUUCUGAAGAGGCAGdTdT	1842	1033-1051	CUGCCUCUUCAGAAAUCdTdT	2409
AD-62075.1	GAAGAGCAGAAAUACUGdTdT	1843	1042-1060	CAGGUUUUCUGCCUCUUCdTdT	2410
AD-62081.1	AGAAAUACCGGCAUAAAAdTdT	1844	1050-1068	UUUGAUGCCAGGUUUUCdTdT	2411
AD-62087.1	GCAUCAAUAUGUCCUCUdTdT	1845	1061-1079	GAGAGGACAUUUUGAUGCdTdT	2412
AD-62093.1	UGUCCUCUCUCCUACAAAAdTdT	1846	1071-1089	UUUGUAGGGAGAGAGGAdTdT	2413
AD-62099.1	GAAUUUGGUUGCUACUCUdTdT	1847	1092-1110	AGGAGUAGCAACCAAUUCdTdT	2414
AD-62105.1	GCUACUCUCUUCUCCUGAdTdT	1848	1102-1120	UCAGGAAAAGAGGAGUAGCdTdT	2415
AD-62064.1	CUCUUUCCUGAAGCCUGGdTdT	1849	1109-1127	CCAGGCUUCAGGAAAAGAdTdT	2416
AD-62070.1	CCUGGGAUCCAUUCCAdTdT	1850	1123-1141	UGGGAUUGGAAUCCAGGdTdT	2417
AD-62076.1	CAUAUCCCAUCAAUGGUCAdTdT	1851	1133-1151	UGCACCUUGAUGGGAUUGdTdT	2418
AD-62082.1	CCAUCAAGGUGCAGGUAAAdTdT	1852	1139-1157	UUAACCGCACCUUGAUGGdTdT	2419
AD-62088.1	CAGGUUAAAGAUUCGUUGdTdT	1853	1150-1168	CAAGCGAAUCUUUAACUGdTdT	2420
AD-62094.1	JUCGCUUGACCAGUUGGUAdTdT	1854	1161-1179	UACCAACUGGUCAAGCGAdTdT	2421
AD-62100.1	CCAGUUGGUAGGAGGUCdTdT	1855	1170-1188	GACUCCUCCUACCAACUGGdTdT	2422
AD-62106.1	GGAGGAGUCCAGUAACAdTdT	1856	1180-1198	GUGUUACUGGGACUCCUCCdTdT	2423
AD-62065.1	CAGUAACACUGAAUGCAdTdT	1857	1190-1208	UGUGCAUUCAGUGUUUCdTdT	2424
AD-62071.1	GAAUGCACAACAAUUGAUdTdT	1858	1200-1218	AUCAAUUGUUUGCAUUCdTdT	2425
AD-62077.1	AACAAUUGAUGUAAACCAAdTdT	1859	1209-1227	UUGGUUACAUCAAUUGUdTdT	2426
AD-62083.1	UAAACCAAGAGACAUUGAdTdT	1860	1220-1238	UCAGAUGUCUUGGUUUAdTdT	2427
AD-62089.1	CAUCUGACUUGGAUCCAAGdTdT	1861	1232-1250	CUUGGAUCCAAGUCAGAUGdTdT	2428
AD-62095.1	GAUCCAAGCAAAGUGUAAAdTdT	1862	1243-1261	UUACACUUUGCUUGGAUCdTdT	2429
AD-62101.1	CAAAAGUGUAACACGUGUdTdT	1863	1251-1269	AACACGUGUACACUUUUGdTdT	2430
AD-62107.1	AACACGUGUUGAUGAGGAdTdT	1864	1260-1278	UCCAUCAUCAACACGUGUdTdT	2431
AD-62066.1	UGAUGGAGUAGCUCCUUdTdT	1865	1272-1290	AAAGGAAGCUACUCCAUAdTdT	2432
AD-62072.1	GUAGCUCCUUUGUCUUAdTdT	1866	1279-1297	UAAGCACAAGGAAGCUACdTdT	2433

AD-62078.1	GCUUAUCUCCCAUCUGGAdTdT	1867	1293-1311	UCCAGAUGGGAGAUUAAGCdTdT	2434
AD-62084.1	CCAUCUGGAGUGACGGUGCdTdT	1868	1303-1321	GCACCGUCACUCCAGAUGGdTdT	2435
AD-62090.1	UGACGGUGCUGGAGUUUAAdTdT	1869	1313-1331	UUA AACUCCAGCACCGUCAdTdT	2436
AD-62096.1	GCUGGAGUUUAUGUCAAdTdT	1870	1320-1338	UUUGACAUUA AACUCCAGCdTdT	2437
AD-62102.1	JGUCAAAACUGAUGCUCCAdTdT	1871	1332-1350	UGGAGCAUCAGUUUGACAdTdT	2438
AD-62108.1	GAUGCUC CAGAU CUUCCAGdTdT	1872	1342-1360	CUGGAAGAU CUGGAGCAUCdTdT	2439
AD-62067.1	CAGAU CUUCCAGA GAAAAdTdT	1873	1349-1367	UUUU CUUCUGGAGAUCUGdTdT	2440
AD-62073.1	AGAAAUCAGGCCAGGGAAdTdT	1874	1362-1380	UUCCCU GGCUGAUUUUCUdTdT	2441
AD-62079.1	GGCCAGGGAAGGUUACCGAdTdT	1875	1371-1389	UCGGUAACCUCCUGGCCdTdT	2442
AD-62085.1	GUUACCGAGCAAUAGCAUAdTdT	1876	1382-1400	UAUGCUAUUGCUGGUAACdTdT	2443
AD-62091.1	AUAGCAUACUACUCUCAdTdT	1877	1393-1411	UGAGAGAUGAGUAUGCUAdTdT	2444
AD-62097.1	JACUCAUCUCUCAGCCAAAdTdT	1878	1399-1417	UUUGGCUGAGAGAUGAUAdTdT	2445
AD-62103.1	GCCAAAGUUACCUUUUAUdTdT	1879	1412-1430	AUUA AAAGGUAACUUUGCdTdT	2446
AD-62109.1	CCUUUAUUAUGAUUGGACUdTdT	1880	1422-1440	AGUCCAAUCAUAUAAAGGdTdT	2447
AD-62115.1	GAUUGGACUGAUACCAUAdTdT	1881	1432-1450	UAUGGUUAUCAGUCCAAUCdTdT	2448
AD-62121.1	CUGAUAAACCAUAAGCCUUdTdT	1882	1439-1457	AAAGCCUUAUGGUUAUCAGdTdT	2449
AD-62127.1	AGGCUUUGCUAGUGGGAGAdTdT	1883	1451-1469	UCUCCACUAGCAAAGCCUdTdT	2450
AD-62133.1	JUGGAGAAACAUUGAAUAdTdT	1884	1462-1480	UAUUCAGAUUGUCCACdTdT	2451
AD-62139.1	CAUCUGAAUAUUAUGUUAdTdT	1885	1471-1489	UAACAAUAUAUUCAGAUdTdT	2452
AD-62145.1	JAUUAUUGUUAACCCAAAdTdT	1886	1479-1497	UUUGGGGUAACAAUAUAdTdT	2453
AD-62151.1	CCCAAAAGCCCAUAUAUUGdTdT	1887	1492-1510	CAAUAUAUGGCCUUUUGGdTdT	2454
AD-62110.1	CCAAAAGCCCAUAUAUUGAdTdT	1888	1493-1511	UCAUAUAUGGCCUUUUGdTdT	2455
AD-62116.1	CAAAAGCCCAUAUAUUGACdTdT	1889	1494-1512	GUCAUAUAUGGCCUUUUGdTdT	2456
AD-62122.1	AAAAGCCCAUAUAUUGACAdTdT	1890	1495-1513	UGUCAUAUAUGGCCUUUdTdT	2457
AD-62128.1	AAAGCCCAUAUAUUGACAAAdTdT	1891	1496-1514	UUGUCAUAUAUGGCCUUdTdT	2458
AD-62134.1	AAGCCCAUAUAUUGACAAAdTdT	1892	1497-1515	UUUGUCAUAUAUGGCCUdTdT	2459
AD-62140.1	AGCCCAUAUAUUGACAAAdTdT	1893	1498-1516	UUUUGUCAUAUAUGGCCUdTdT	2460
AD-62146.1	GCCCAUAUAUUGACAAAUdTdT	1894	1499-1517	AUUUUGUCAUAUAUGGCCdTdT	2461
AD-62152.1	CCCAUAUAUUGACAAAUAdTdT	1895	1500-1518	UAUUUUGUCAUAUAUGGGdTdT	2462
AD-62111.1	CCAUAUAUUGACAAAUAdTdT	1896	1501-1519	UUUUUUGUCAUAUAUGGdTdT	2463
AD-62117.1	CAUAUAUUGACAAAUACdTdT	1897	1502-1520	GUUAUUUUGUCAUAUAUGdTdT	2464
AD-62123.1	AUAUAUUGACAAAUACUdTdT	1898	1503-1521	AGUUAUUUUGUCAUAUAUdTdT	2465
AD-62129.1	JAUUAUUGACAAAUACUCdTdT	1899	1504-1522	GAGUUAUUUUGUCAUAUAUdTdT	2466
AD-62135.1	AUAUUGACAAAUACUCAdTdT	1900	1505-1523	UGAGUUAUUUUGUCAUAUAUdTdT	2467
AD-62141.1	JAUUGACAAAUACUCACdTdT	1901	1506-1524	GUGAGUUAUUUUGUCAUAUAUdTdT	2468
AD-62147.1	AUUGACAAAUACUCACUdTdT	1902	1507-1525	AGUGAGUUAUUUUGUCAUAUAUdTdT	2469
AD-62153.1	JUGACAAAUACUCACUAdTdT	1903	1508-1526	UAGUGAGUUAUUUUGUCAAdTdT	2470
AD-62112.1	UGACAAAUACUCACUAUdTdT	1904	1509-1527	AUAGUGAGUUAUUUUGUCAdTdT	2471
AD-62118.1	GACAAAUACUCACUAUAdTdT	1905	1510-1528	UAUAGUGAGUUAUUUUGUCdTdT	2472
AD-62124.1	AAAAUAACUCACUAUAUUdTdT	1906	1513-1531	AAUUUAAGUGAGUUAUUUdTdT	2473
AD-62130.1	AAUAACUCACUAUAUUAdTdT	1907	1514-1532	UAAUUAAGUGAGUUAUUUdTdT	2474
AD-62136.1	AAUAACUCACUAUAUUACdTdT	1908	1515-1533	GUAUUUAAGUGAGUUAUUdTdT	2475
AD-62142.1	AUAACUCACUAUAUUACUdTdT	1909	1516-1534	AGUAAUUAAGUGAGUUAUUdTdT	2476
AD-62148.1	AACUCACUAUAUUACUUGdTdT	1910	1518-1536	CAAGUAAUUAAGUGAGUUdTdT	2477

AD-62154.1	ACUCACUAAUUAUACUUGAdTdT	1911	1519-1537	UCAAGUAAUUAUAGUGAGUdTdT	2478
AD-62113.1	CUCACUAAUUAUACUUGAUdTdT	1912	1520-1538	AUCAAGUAAUUAUAGUGAGdTdT	2479
AD-62119.1	UCACUAAUUAUACUUGAUdTdT	1913	1521-1539	AAUCAAGUAAUUAUAGUGAdTdT	2480
AD-62125.1	ACUAAUUAUACUUGAUUUdTdT	1914	1523-1541	AAAAUCAAGUAAUUAUAGUdTdT	2481
AD-62131.1	CUAAUUAUACUUGAUUUAdTdT	1915	1524-1542	UAAAAUCAAGUAAUUAUAGdTdT	2482
AD-62137.1	JAUAAUUAUACUUGAUUUAdTdT	1916	1525-1543	AUAAAAUCAAGUAAUUAUAdTdT	2483
AD-62143.1	AUAAUUAUACUUGAUUUAdTdT	1917	1526-1544	GAUAAAAUCAAGUAAUUAUdTdT	2484
AD-62149.1	JAAUUAUACUUGAUUUUAdTdT	1918	1527-1545	GGUAAAAUCAAGUAAUUAUdTdT	2485
AD-62155.1	AAUUAUACUUGAUUUUAdTdT	1919	1528-1546	UGGAUAAAAUCAAGUAAUdTdT	2486
AD-62114.1	AUUACUUGAUUUUAUCCAdTdT	1920	1529-1547	UUGGAUAAAAUCAAGUAAUdTdT	2487
AD-62120.1	UUAUCCAAGGGCAAAUAdTdT	1921	1540-1558	UAAUUUUGCCCUUGGAUAdTdT	2488
AD-62126.1	GCAAAUUAUCCACUUUGGdTdT	1922	1550-1568	CCAAAGUGGAUAAUUUUGCdTdT	2489
AD-62132.1	CACUUUGGCACGAGGGAGdTdT	1923	1561-1579	UCUCCUCGUGCCAAGUGdTdT	2490
AD-62138.1	CGAGGGAGAAUUAUCCAGdTdT	1924	1571-1589	UCUGAAAAUUUCUCCUCGdTdT	2491
AD-62144.1	AUUUUCAGAUUGCAUUAUdTdT	1925	1581-1599	AUAAGAUGCAUCUGAAAUdTdT	2492
AD-62150.1	GCAUCUUAUCAAGUAUUAAdTdT	1926	1591-1609	UUUAUCUUUGAUUAAGUAdTdT	2493
AD-62156.1	CAAAGUAUAAACAUUCCAGdTdT	1927	1600-1618	CUGGAUGUUUAUACUUUGdTdT	2494
AD-62162.1	AUUCAGUAACACAGAACdTdT	1928	1612-1630	UGUUCUGUGUUAUCUGGAUdTdT	2495
AD-62168.1	CACAGAACAUGGUCCUUCdTdT	1929	1622-1640	GAAGGAACCAUGUUCUGUGdTdT	2496
AD-62174.1	GGUCCUUAUCCCGACUAdTdT	1930	1632-1650	AAGUCGGGAUGAAGGAACCDdTdT	2497
AD-62180.1	CCCACUUCUGGUCUUAUAdTdT	1931	1643-1661	UAAUAGACCAGAAGUCGGGdTdT	2498
AD-62186.1	GGUCUUAUACAUUGCACAdTdT	1932	1653-1671	UGUGACGAUGAAUAGACCDdTdT	2499
AD-62192.1	AUCGUCACAGGAGAACAGdTdT	1933	1663-1681	UCUGUUCUCCUGACGAUdTdT	2500
AD-62198.1	CAGGAGAACAGACAGCAGdTdT	1934	1670-1688	UCUGCUGUCUGUUCUCCUGdTdT	2501
AD-62157.1	CAGCAGAAUUAUGUCUGAdTdT	1935	1682-1700	UCAGACACUAAUUCUGUGdTdT	2502
AD-62163.1	GUGUCUGAUUCAGUCUGUdTdT	1936	1693-1711	ACCAGACUGAAUCAGACAdTdT	2503
AD-62169.1	CAGUCUGUUAAUUAUUGAdTdT	1937	1703-1721	UCAUAUUUAACCAGACUGdTdT	2504
AD-62175.1	GUUAAUUAUUGAAGAAAAdTdT	1938	1710-1728	UUUUUCUCAAUUUUUAACdTdT	2505
AD-62181.1	AGAAAAUGUGGCAACCAGdTdT	1939	1722-1740	CUGGUUGCCCAUUUUUCUdTdT	2506
AD-62187.1	GCAACCAGCUCAGGUUCAdTdT	1940	1733-1751	UGAACCGGAGCUGGUUGCdTdT	2507
AD-62193.1	GCUCAGGUUCAUCUGUCUdTdT	1941	1740-1758	AGACAGAUGAACCGGAGCdTdT	2508
AD-62199.1	AUCUGUCUCCUGAUGCAGdTdT	1942	1751-1769	UCUGCAUCAGGAGACAGAUdTdT	2509
AD-62158.1	GAUGCAGAUCAUUAUCUdTdT	1943	1762-1780	GAGAAUUAUGCAUCUGCAUdTdT	2510
AD-62164.1	GCAUUAUUCUCCAGGCCAAAdTdT	1944	1771-1789	UUUGGCCUGGAGAAUUGCdTdT	2511
AD-62170.1	AGGCCAAACUGUGUCUAdTdT	1945	1782-1800	AAGAGACACAGUUUGGCCUdTdT	2512
AD-62176.1	GUGUCUCUUAUUAUGGCAAdTdT	1946	1792-1810	UUGCCAUAUUAAGAGACAdTdT	2513
AD-62182.1	JUAAUAUGGCAACUGGAAUdTdT	1947	1799-1817	AUUCAGUUGCCAUAUUAAdTdT	2514
AD-62188.1	AACUGGAAUGGAUCCUGGdTdT	1948	1809-1827	CCAGGAAUCCAUCCAGUAdTdT	2515
AD-62194.1	UUCCUGGGUGCAUUAGCAdTdT	1949	1821-1839	UGCUAUUGCCACCCAGGAAdTdT	2516
AD-62200.1	GGCAUUAAGCAGCAGUGGAdTdT	1950	1830-1848	GUCCACUGCUGCUAUGCCdTdT	2517
AD-62159.1	AGUGGACAGUCUGUGUAUdTdT	1951	1842-1860	AUACACAGCACUGUCCACUdTdT	2518
AD-62165.1	GCUGUGUAUGGAGUCCAAAdTdT	1952	1852-1870	UUUGGACUCCAUAACACAGCdTdT	2519
AD-62171.1	AGUCCAAAGAGGAGCCAAAdTdT	1953	1863-1881	UUUGGCCUCCUUUGGACUdTdT	2520
AD-62177.1	AGAGGAGCCAAAAAGCCUdTdT	1954	1870-1888	AGGGCUUUUUGGCCUCCUdTdT	2521

AD-62183.1	AGCCCUUGGAAAGAGUAUUdTdT	1955	1883-1901	AAUACUCUUUCCAAGGGCudTdT	2522
AD-62189.1	AAGAGUAUUCAAUUCUUAdTdT	1956	1893-1911	UAAGAAUUGAAAUACUCUUdTdT	2523
AD-62195.1	UUUCAAUUUUAGAGAAdTdT	1957	1900-1918	UCUUCUCUAAGAAUUGAAAdTdT	2524
AD-62201.1	GAGAAGAGUGAUCUGGGCudTdT	1958	1912-1930	AGCCCAAGUACUCUCUCudTdT	2525
AD-62160.1	JGAUCUGGGCUGUGGGCAdTdT	1959	1920-1938	UGCCCCACAGCCCAAGUAdTdT	2526
AD-62166.1	GGGCAGGUGUGGCCUAdTdT	1960	1933-1951	UGAGGCCACCACCGCCCCdTdT	2527
AD-62172.1	GUGGCCUCAACAAUGCCAAdTdT	1961	1943-1961	UUGGCAUUGUUGAGGCCAdTdT	2528
AD-62178.1	CAACAAUGCCAAUGUUCdTdT	1962	1950-1968	GAACACAUUGGCAUUGUUGdTdT	2529
AD-62184.1	CAAUGUUCACCUCAGCudTdT	1963	1959-1977	AGCUAGGUGGAACACAUUGdTdT	2530
AD-62190.1	CACCUAGCUGACUUACCUdTdT	1964	1969-1987	AGGUAGUCCAGCUGAGGudTdT	2531
AD-62196.1	GACUUACCUUCUCACUAdTdT	1965	1979-1997	UUAGUGAGGAAGUUAAGUCdTdT	2532
AD-62202.1	UCACUAAUGCAAUUCAGAdTdT	1966	1991-2009	UCUGCAUUUGCAUUAGUGAdTdT	2533
AD-62161.1	AAAUGCAGUAGACUCCCAAdTdT	1967	2001-2019	UUGGGAGUCAUCUGCAUUdTdT	2534
AD-62167.1	CUCCCAAGAAAUGAUGAAdTdT	1968	2013-2031	UUCAUCAUUUUUUGGGAGdTdT	2535
AD-62173.1	CCUUGUAAAGAAUUCUAdTdT	1969	2032-2050	UGAGAAUUUCUUUACAAGGdTdT	2536
AD-62179.1	AAUUCUCAGGCCAAGAAdTdT	1970	2043-2061	UCUUCUUGGCCUGAGAAUdTdT	2537
AD-62185.1	CCAAGAAGAACGCUGCAAAdTdT	1971	2053-2071	UUUGCAGCGUUCUUCUUGGdTdT	2538
AD-62191.1	CGCUGCAAAGAAGAUAGAdTdT	1972	2063-2081	UCUAUCUUCUUUUGCAGCGdTdT	2539
AD-62197.1	AAAGAAGAUAGAAGAAUAdTdT	1973	2070-2088	UAUUUCUUCUAUCUUCUUdTdT	2540
AD-62203.1	AGAAUAGCUGCUAAAUAdTdT	1974	2082-2100	AUAUUUAGCAGCUUUUCdTdT	2541
AD-62209.1	GCUGCUAAAUUAAACAAdTdT	1975	2089-2107	AAUGUUUAUUUAGCAGCdTdT	2542
AD-62215.1	ACAUCAGUAGUGAAGAAAdTdT	1976	2103-2121	UUUCUUCACUACUGAAUGdTdT	2543
AD-62221.1	GUAGUGAAGAAUUGUUGdTdT	1977	2110-2128	AACAACAUUUUCUACUAdTdT	2544
AD-62227.1	AAUUGUUGUACGAUGGAGdTdT	1978	2119-2137	CUCCAUCGUAACAACAUUdTdT	2545
AD-62233.1	CGAUGGAGCCUGCGUAAUdTdT	1979	2130-2148	AUUAAACGAGCCUCCAUCGdTdT	2546
AD-62239.1	CGUUAAUUAUGAUGAAACCDTdT	1980	2142-2160	GGUUUCAUCAUUUAACGdTdT	2547
AD-62245.1	AUGAUGAAACCGUGAGCAdTdT	1981	2150-2168	UGCUCACAGUUUCAUAdTdT	2548
AD-62204.1	CUGUGAGCAGCGAGCUGCAdTdT	1982	2160-2178	UGCAGCUGCGUCUCACAGdTdT	2549
AD-62210.1	CGAGCUGCACGAAUAGUAdTdT	1983	2170-2188	AACUAAUCCGUGCAGCUGdTdT	2550
AD-62216.1	GGAUUAGUUUAGGGCCAAGdTdT	1984	2180-2198	CUUGGCCCUAAACUAAUCCdTdT	2551
AD-62222.1	GGGCCAAGAUCAUCAAGdTdT	1985	2191-2209	CUUUGAUGCAUCUUGGCCdTdT	2552
AD-62228.1	CAUCAAGCUUUCACUGAAAdTdT	1986	2202-2220	UUCAGUGAAAGCUUUGAUGdTdT	2553
AD-62234.1	GCUUCACUGAAUUGUGdTdT	1987	2209-2227	CACAACAUCAGUGAAAGCdTdT	2554
AD-62240.1	AAUGUUGUGUCGCGCAAGdTdT	1988	2219-2237	CUUGCGACGACACAACAUdTdT	2555
AD-62246.1	CGUCGCAAGCCAGCUCGdTdT	1989	2229-2247	ACGGAGCUGGCUUGCGAGdTdT	2556
AD-62205.1	GCUCCGUCUAAUUCUCdTdT	1990	2241-2259	AGAGAUUUAGCACGGAGCdTdT	2557
AD-62211.1	CUAAUUCUCUCAUAAAGAdTdT	1991	2249-2267	UCUUUAUGAGAGAUUUAGdTdT	2558
AD-62217.1	AAAGACAUCAAUUGGAAAdTdT	1992	2263-2281	UUCCAAUUGCAUGUCUUdTdT	2559
AD-62223.1	CAAUUGGAAGGCUACAdTdT	1993	2272-2290	UGUGUAGCCUUCCAAUUGdTdT	2560
AD-62229.1	GCUACACAUGAAGACCCUGdTdT	1994	2283-2301	CAGGGUCUUCUUGUAGCdTdT	2561
AD-62235.1	CAUGAAGACCCUGUACAdTdT	1995	2289-2307	UGGUAAACAGGGUCUUCAGdTdT	2562
AD-62241.1	UACCAGUAAGCAAGCCAGAdTdT	1996	2303-2321	UCUGGCUUGCUUACUGGAdTdT	2563
AD-62247.1	AGCAAGCCAGAAUUCGGAdTdT	1997	2311-2329	UCCGAAUUCUGGCUUGCdTdT	2564
AD-62206.1	AGAAAUUCGGAGUUUUUdTdT	1998	2319-2337	AAAUAACUCCGAAUUUCdTdT	2565

AD-62212.1	AGUUUUUUCAGAAAGCudTdT	1999	2329-2347	AGCUUUCUGAAAAUAACudTdT	2566
AD-62218.1	CAGAAAGCUGGUUGGGAdTdT	2000	2339-2357	UCCACAACCAGCUUUCUGdTdT	2567
AD-62224.1	GUGGAAGUUCUUCUUGUdTdT	2001	2352-2370	AACAAGAUAACUCCACdTdT	2568
AD-62230.1	JCAUCUUGUCCAGAGAdTdT	2002	2361-2379	UCUUCUGGGAACAAGUAdTdT	2569
AD-62236.1	CCAGAAGAAAACAGUUGCAdTdT	2003	2372-2390	UGCAACUGUUUCUUGGdTdT	2570
AD-62242.1	CAGUUGCAGUUUGCCUACdTdT	2004	2383-2401	GUAGGGCAAACUGCAACUGdTdT	2571
AD-62248.1	CAGUUUGCCUACUGAUdTdT	2005	2389-2407	AAUCAGGUAGGCAACUGdTdT	2572
AD-62207.1	CCUGAUUCUCUAACCACCUdTdT	2006	2401-2419	AGGUGGUUAGAGAAUCAGGdTdT	2573
AD-62213.1	ACCACUGGGAAAUUCAAGdTdT	2007	2413-2431	CUUGAAUUCCAGGUGdTdT	2574
AD-62219.1	GAAAUUCAAGCGUUGCAdTdT	2008	2422-2440	UGCCAACGCCUUGAAUUUCdTdT	2575
AD-62225.1	CGUUGGCAUUUCAACCUdTdT	2009	2433-2451	AGUGUUUGAAUUGCCAACGdTdT	2576
AD-62231.1	CAUUUCAAACACUGGUUAdTdT	2010	2439-2457	UAUACCAGUGUUUGAAUUGdTdT	2577
AD-62237.1	GUAUAUGUGUUGCUGAUACdTdT	2011	2453-2471	GUAUCAGCAACACAUAUACdTdT	2578
AD-62243.1	UGCUGAUACUGUCAAGCAdTdT	2012	2463-2481	UGCCUUGACAGUAUCAGCAdTdT	2579
AD-62249.1	CUGUCAAGGCAAGGUGUdTdT	2013	2471-2489	AACACCUUUGCCUUGACAGdTdT	2580
AD-62208.1	AGGUGUUCAAAGAUGUCUdTdT	2014	2483-2501	AAGACAUCUUUGAACCCUdTdT	2581
AD-62214.1	CAAAGAUGUCUCCUGGAAdTdT	2015	2490-2508	UUCAGGAAGACAUCUUUGdTdT	2582
AD-62220.1	CUUCCUGGAAUAGAUUAdTdT	2016	2499-2517	UAUAUUCAUUCCAGGAAGdTdT	2583
AD-62226.1	GAAUAUACCAUAUUCUGUdTdT	2017	2511-2529	AACAGAAUUGGUUAUUCdTdT	2584
AD-62232.1	AUAUUCUGUUGUACGAGAdTdT	2018	2520-2538	UCCUCGUACAACAGAAUAdTdT	2585
AD-62238.1	CGAGGAGAACAGAUCCAUdTdT	2019	2533-2551	AUUGGAUCUGUUCUCCUGdTdT	2586
AD-62244.1	GAACAGAUCCAAUUGAAAGdTdT	2020	2539-2557	CUUCAAUUGGAUCUGUUCdTdT	2587
AD-61874.1	GAAAGGAACUGUUUACAACdTdT	2021	2553-2571	GUUGUAAACAGUCCUUUCdTdT	2588
AD-61880.1	ACUGUUUACAACUAUAGGAdTdT	2022	2560-2578	UCCUAUAGUUGUAAACAGUdTdT	2589
AD-61886.1	AACUAUAGGACUUCUGGAdTdT	2023	2569-2587	UCCCAGAAGUCCUAUAGUdTdT	2590
AD-61892.1	UGGGAUGCAGUUCUGUGUdTdT	2024	2583-2601	AACACAGAACUGCAUCCAdTdT	2591
AD-61898.1	GUUCUGUGUUAAAUGUCUdTdT	2025	2592-2610	AGACAUUUUAAACAGAACdTdT	2592
AD-61904.1	UUAAAUGUCUGCUGGAdTdT	2026	2600-2618	UCCACAGCAGACAUUUUAdTdT	2593
AD-61910.1	CUGUGGAGGAAUCUGCACdTdT	2027	2612-2630	GUGCAGAUUCCUCCACAGdTdT	2594
AD-61916.1	GGAAUCUGCACUUCGGAAdTdT	2028	2620-2638	UUUCCGAAGUGCAGAUUCCdTdT	2595
AD-61875.1	CGGAAAGCCCAGUCAUUGAdTdT	2029	2633-2651	UCAUAGACUGGGCUUCCGdTdT	2596
AD-61881.1	CCAGUCAUUGAUCAUCAGGdTdT	2030	2641-2659	CCUGAUGAUCAUUGACUGGdTdT	2597
AD-61887.1	CAUCAGGGCACAAAGUCUdTdT	2031	2653-2671	AGGACUUUGGCCUGAUGdTdT	2598
AD-61893.1	GGCACAAGUCCUCCAAUdTdT	2032	2659-2677	AUUUGGAGGACUUUGGCCdTdT	2599
AD-61899.1	CAAAUGUGUGCGCCAGAAAdTdT	2033	2673-2691	UUUCUGGCGCACAAUUGdTdT	2600
AD-61905.1	GCGCCAGAAAGUAGAGGGCAdTdT	2034	2682-2700	GCCUCUACUUCUGGCGCAdTdT	2601
AD-61911.1	AGUAGAGGGCUCUCCAGUdTdT	2035	2691-2709	ACUGGAGGAGCCUCUACUdTdT	2602
AD-61917.1	CCUCCAGUCACUUGGUGACdTdT	2036	2702-2720	GUCACCAAGUGACUGGAGGdTdT	2603
AD-61876.1	UCACUUGGUGACAUUCACUdTdT	2037	2709-2727	AGUGAAUGUCACCAAGUGAdTdT	2604
AD-61882.1	CAUUCACUGUGCUUCCUCUdTdT	2038	2720-2738	AGAGGAAGCACAGUGAAUGdTdT	2605
AD-61888.1	GGAAAUUGGCCUUCACAACdTdT	2039	2739-2757	GUUGUGAAGGCCAAUUUCCdTdT	2606
AD-61894.1	CUUCACAACAUAUUUUUdTdT	2040	2749-2767	AAAAUUUGAUGUUGUGAAGdTdT	2607
AD-61900.1	AAUUUUUCACUGGAGACUdTdT	2041	2761-2779	AAGUCUCCAGUGAAAAUUdTdT	2608
AD-61906.1	CUGGAGACUUGGUUGGAAdTdT	2042	2770-2788	UUCCAAACCAAGUCUCCAGdTdT	2609

AD-61912.1	GGUUUGAAAAGAAAUUUdTdT	2043	2780-2798	AAGAUUUUUUCCAAACcdTdT	2610
AD-61918.1	AAUCUUAGUAAAAACAUUAdTdT	2044	2793-2811	UAAUGUUUUUACUAAAGAUdTdT	2611
AD-61877.1	AAAAACAUUACGAGUGGUGdTdT	2045	2802-2820	CACCACUCGUAAUGUUUUdTdT	2612
AD-61883.1	GAGUGGUGCCAGAAGGUGdTdT	2046	2813-2831	ACACCUUCUGGCACCACUCdTdT	2613
AD-61889.1	AGAAGGUGUCAAAAGGGAAdTdT	2047	2823-2841	UUCUUUUUGACACCUUCdTdT	2614
AD-61895.1	JGUCAAAAGGAAAGCUAUdTdT	2048	2829-2847	AUAGCUUUCCUUUUGACAdTdT	2615
AD-61901.1	GCUAUUCUGGUGUUAUUdTdT	2049	2843-2861	AAAGUAACACCAGAAUAGcdTdT	2616
AD-61907.1	GUGUUACUUUGGAUCCUAGdTdT	2050	2852-2870	CUAGGAUCCAAAGUAACAdTdT	2617
AD-61913.1	GGAUCCUAGGGUUAUUAdTdT	2051	2862-2880	AUAAAUACCCUAGGAUCCdTdT	2618
AD-61919.1	GGUAUUUAUGGUACCAUUAdTdT	2052	2872-2890	UAAUGGUACCAUAAAUACcdTdT	2619
AD-61878.1	GUACCAUUGAGCAGACGAAAdTdT	2053	2882-2900	UUUCGUCUGCUAAUGGUACdTdT	2620
AD-61884.1	CAGACGAAAGGAGUCCAdTdT	2054	2892-2910	UGGGAACUCCUUUCGUCGdTdT	2621
AD-61890.1	AGGAGUCCCAUACAGGAUdTdT	2055	2900-2918	AUCCUGUAUGGGAACUCCdTdT	2622
AD-61896.1	CAUACAGGAUACCCUAGAdTdT	2056	2909-2927	UCUAAGGGUAUCCUGUAUGdTdT	2623
AD-61902.1	CUUAGAUUUGGUCCCAAAdTdT	2057	2922-2940	UUUGGGGACCAAAUCUAAAdTdT	2624
AD-61908.1	UCCCAAACAGAAUCAAAdTdT	2058	2933-2951	UUGAUUUCUGUUUUGGGAdTdT	2625
AD-61914.1	ACAGAAAUCAAAAGGAUUdTdT	2059	2941-2959	AAAUCCUUUUGAUUUCUGdTdT	2626
AD-61920.1	AAAGGAUUUUGAGUGAAAdTdT	2060	2951-2969	UUUACACUCAAAAUCUUdTdT	2627
AD-61879.1	AGUGUAAAAGGACUGCUUGdTdT	2061	2962-2980	CAAGCAGUCCUUUACACUdTdT	2628
AD-61885.1	AAGGACUGCUUGUAGGUGAdTdT	2062	2969-2987	UCACCUACAAGCAGUCCUdTdT	2629
AD-61891.1	SUAGGUGAGAUCUUGUCUGdTdT	2063	2980-2998	CAGACAAGAUUCACCUACdTdT	2630
AD-61897.1	AUCUUGUCUGCAGUUCUAdTdT	2064	2989-3007	UUAGAACUGCAGACAAGAUdTdT	2631
AD-61903.1	SUUCUAAGUCAGGAAGGCAdTdT	2065	3001-3019	UGCCUUCUGACUUAGAAdTdT	2632
AD-61909.1	GAAGGCAUCAUAUCCUAdTdT	2066	3013-3031	SUAGGAUAUUGAUCCUUCdTdT	2633
AD-61915.1	UCAUAUCCUAACCCACUdTdT	2067	3020-3038	AGGUGGUUAGGAUAUUAdTdT	2634
AD-61921.1	CCACCUCCCCAAAGGAGUdTdT	2068	3033-3051	ACUCCUUUGGGAGGUGdTdT	2635
AD-61927.1	CCCCAAAGGGAGUGCAGAdTdT	2069	3039-3057	CUCUGCACUCCUUUGGGdTdT	2636
AD-61933.1	GUGCAGAGGGGAGCUGAUdTdT	2070	3050-3068	AUCAGUCCGCCUCUGACAdTdT	2637
AD-61939.1	GGAGCUGAUGAGCGUUGUCdTdT	2071	3060-3078	GACAACGCUCAUCAGCUCcdTdT	2638
AD-61945.1	CGUUGUCCAGUAUUCUAdTdT	2072	3072-3090	AUAGAAUACUGGGACAACGdTdT	2639
AD-61951.1	CCAGUAUUCUAUGUUUUCdTdT	2073	3079-3097	GAAAAACAUAGAAUACUGGdTdT	2640
AD-61957.1	SUUUUUCACUACCCUGGAAAdTdT	2074	3091-3109	SUUCCAGGUAUGAAAAACdTdT	2641
AD-61963.1	CCUGGAAACAGGAAUCAUdTdT	2075	3102-3120	AUGAUUCCUGUUUCCAGGdTdT	2642
AD-61922.1	GGAACAUUUUCAUUCUGAdTdT	2076	3122-3140	UCAGAAUGAAAAUGUCCdTdT	2643
AD-61928.1	CAUUCUGACCAUUAUUGdTdT	2077	3133-3151	CAAUUAUUGGUCAGAAUGdTdT	2644
AD-61934.1	CCAUAUAUUGAAAAGCAGAdTdT	2078	3142-3160	UCUGCUUUUCAUUAAUGGdTdT	2645
AD-61940.1	AAAGCAGAAACUGAAGAAAdTdT	2079	3153-3171	SUUUCUUCAGUUUCUGCUUdTdT	2646
AD-61946.1	AACUGAAGAAAAAUAAAAdTdT	2080	3161-3179	SUUAAAAUUUUUCUUCAGUdTdT	2647
AD-61952.1	AAAAAAUUAAAAGGAGAdTdT	2081	3169-3187	UCCUUCUUUUAAUUUUUdTdT	2648
AD-61958.1	AGGGAUGUUGAGCAUUAUGdTdT	2082	3183-3201	CAUAAUGCUCAAAUCCUdTdT	2649
AD-61964.1	GAGCAUUAUGUCCUACAGAdTdT	2083	3192-3210	UCUGUAGGACAUAAUGCUcdTdT	2650
AD-61923.1	UGUCCUACAGAAUUCUGAdTdT	2084	3200-3218	UCAGCAUUCUGUAGGACAdTdT	2651
AD-61929.1	AAUGCUGACUACUCUACAdTdT	2085	3211-3229	UGUAAGAGUAGUCAGCAUdTdT	2652
AD-61935.1	UACUCUACAGUGUGGAdTdT	2086	3220-3238	UCCACACUGUAAGAUAdTdT	2653

AD-61941.1	AGUGUGGGAAGGGUGGAAAdTdT	2087	3229-3247	UCCACCCUCCACACAdTdT	2654
AD-61947.1	GGGUGGAAGUCUAGCACAdTdT	2088	3240-3258	AGUCUAGCACUCCACCCAdTdT	2655
AD-61953.1	GCUAGCACUUGGUUACAGdTdT	2089	3250-3268	CUGUUAACCAAGUCUAGCdTdT	2656
AD-61959.1	GGUUAACAGCUUUUGCUUdTdT	2090	3260-3278	AAAGCAAAGCUGUUAACCCdTdT	2657
AD-61965.1	JGCUUUAAGAGUACUUGGAdTdT	2091	3273-3291	UCCAAGUACUCUUAAGCAdTdT	2658
AD-61924.1	SUACUUGGACAAGUAAUAdTdT	2092	3283-3301	UAUUUACUUGUCCAAGUACdTdT	2659
AD-61930.1	CAAGUAAAUAUACGUAGdTdT	2093	3292-3310	CUACGUUUUUUUACUUGdTdT	2660
AD-61936.1	AUAAAACGUAGAGCAGAdTdT	2094	3299-3317	UUCUGCUCUACGUUUUAdTdT	2661
AD-61942.1	GAGCAGAACCAAAUUCAdTdT	2095	3310-3328	UUGAAUUUUGGUUCUGCUCdTdT	2662
AD-61948.1	AAUUCAAUUGUAAUUCUdTdT	2096	3322-3340	AAGAAUACAAUUGAAUdTdT	2663
AD-61954.1	GUAAUUCUUUUAUGGUCdTdT	2097	3332-3350	AGCCACAUAUAAAGAAUACdTdT	2664
AD-61960.1	AUUGUGGCUAGUUGAGAAUdTdT	2098	3342-3360	AUUCUCAACUAGCCACAAdTdT	2665
AD-61966.1	CUAGUUGAGAAUUAUCAAdTdT	2099	3349-3367	AUUGAAUUAUCUACUAGdTdT	2666
AD-61925.1	UUAUCAAUUAGAAUUGAdTdT	2100	3360-3378	UCCAUAUUCUAAUUGAAUAdTdT	2667
AD-61931.1	AAUGGAUCUUUCAAGGAAAdTdT	2101	3373-3391	UUUCCUUGAAAGAUCCAAdTdT	2668
AD-61937.1	CUUUCAAGGAAAUUCACAdTdT	2102	3380-3398	UGUGAAUUUCCUUGAAAGdTdT	2669
AD-61943.1	AAUUCACAGUAUCAACCAAdTdT	2103	3391-3409	UUGGUUGAUACUGUGAAUdTdT	2670
AD-61949.1	GUAUCAACCAUAAUUAAdTdT	2104	3399-3417	UAAUUUUUAUUGGUUGAUACdTdT	2671
AD-61955.1	AAAAUUACAGGGUACCUUGdTdT	2105	3411-3429	CAAGGUACCCUGUAAUUUdTdT	2672
AD-61961.1	AGGGUACCUUGCCUGUGAdTdT	2106	3419-3437	UCAACAGGCAAGGUACCCdTdT	2673
AD-61967.1	SUUGAAGCCCAGAGACAdTdT	2107	3433-3451	UGUUCUCUGGGCUUCAACdTdT	2674
AD-61926.1	CCGAGAGAACAGCUUUAUdTdT	2108	3441-3459	AUAUAAGCUGUCUCUCGdTdT	2675
AD-61932.1	GCUUAUAUCUACAGCCUdTdT	2109	3452-3470	AAGGCUUAAGAUUAAGCdTdT	2676
AD-61938.1	CUUACAGCCUUACUGUGAdTdT	2110	3460-3478	UCACAGUAAAGGCUUAGdTdT	2677
AD-61944.1	GAAUUAGAAAGGCUUCGAdTdT	2111	3482-3500	UCGAAAGCCUUUCUAAUUCdTdT	2678
AD-61950.1	GGCUUUCGAUUAUUGCCCCdTdT	2112	3492-3510	GGGGCAUUAUCGAAAGCCdTdT	2679
AD-61956.1	GAUUAUUGCCCCUGGUGAdTdT	2113	3499-3517	UCACCAGGGGCAUUAUUCdTdT	2680
AD-61962.1	GGUGAAAUCGACACAGCAdTdT	2114	3513-3531	AGCUGUGUCGAUUUACCCdTdT	2681
AD-61968.1	CGACACAGCUCUAAUUAAdTdT	2115	3522-3540	UUUAAUAGAGCUGUGCGdTdT	2682
AD-61974.1	GUCUAAUUAUAGCUGACAdTdT	2116	3529-3547	UGUCAGCUUUAAUAGAGCdTdT	2683
AD-61980.1	CUGACAACUUUCUGCUUGAdTdT	2117	3542-3560	UCAAGCAGAAAGUUGUCAGdTdT	2684
AD-61986.1	CUUUCUGCUUGAAAUACAdTdT	2118	3549-3567	UGUAUUUUAAGCAGAAAGdTdT	2685
AD-61992.1	AAAAUACACUGCCAGCCAdTdT	2119	3560-3578	UGGGCUGGAGUGUAAUUdTdT	2686
AD-61998.1	AGCCCAGAGCACCUUACAdTdT	2120	3573-3591	UGUAAAGGUCUCUGGGCAdTdT	2687
AD-62004.1	GCACCUUUAUUGGCCAUdTdT	2121	3581-3599	AUGGCCAAUGUAAAGGUCdTdT	2688
AD-62010.1	ACAUUGGCCAUUCUGCGUdTdT	2122	3589-3607	ACGCAGAAUUGGCCAAUGdTdT	2689
AD-61969.1	CUGCGUAUGCUCUUCCUdTdT	2123	3602-3620	AGGGAAAGAGCAUACGAGdTdT	2690
AD-61975.1	CUUCCUGGGAGAUAAAAdTdT	2124	3613-3631	UUUUUUCUCCAGGGAAAGdTdT	2691
AD-61981.1	GAGAUAAAACUACCCAdTdT	2125	3623-3641	UGUGGGUGAGUUUUAUCdTdT	2692
AD-61987.1	ACUCACCCACAGUUUCGUdTdT	2126	3631-3649	AACGAAACUGUGGUGAGUdTdT	2693
AD-61993.1	CAGUUUCGUCAAUUGUUdTdT	2127	3640-3658	AAACAAUUGAACGAAACUgTdT	2694
AD-61999.1	CAAUUGUUACGUUUGAAAdTdT	2128	3650-3668	UUCAAAGCUGAAACAAUUGdTdT	2695
AD-62005.1	CUUUGAAGAGAGAAGCUUdTdT	2129	3662-3680	AAAGCUUCUCUUCUAAAGdTdT	2696
AD-62011.1	GAGAGAAGCUUUGGUAAAAdTdT	2130	3669-3687	UUUAACCAAGCUUCUCdTdT	2697

AD-61970.1	GUUAAAGGUAUCCACCCAdTdT	2131	3682-3700	UGGGUGGAUUACCUUUAACdTdT	2698
AD-61976.1	AAUCCACCCAUUUUUCGUUdTdT	2132	3691-3709	AACGAUAAAUGGGUGGAUdTdT	2699
AD-61982.1	CAUUUAUCGUUUUUGGAAAdTdT	2133	3699-3717	UUUCCAAAACGAUAAAUGdTdT	2700
AD-61988.1	JUUGGAAAGACAAUCUCAdTdT	2134	3710-3728	UGAAGAUUGUCUUUCCAAAdTdT	2701
AD-61994.1	AAUCUUCAGCAUAAAGACAdTdT	2135	3721-3739	UGUCUUUAUGCUGAAGAUdTdT	2702
AD-62006.1	CUCUGUACCUAACACUGGUdTdT	2136	3741-3759	ACCAGUUVUAGGUACAGAGdTdT	2703
AD-62012.1	ACACUGGUACGGCACGUAdTdT	2137	3752-3770	AUACGUGCCGUACCAGUGdTdT	2704
AD-61971.1	GGCAGUAUGGUAGAAACAdTdT	2138	3762-3780	UGUUUCUACCAUACGUGCCdTdT	2705
AD-61977.1	GGUAGAAACAACUGCCUAdTdT	2139	3771-3789	AUAGGCAGUUGUUUCUACdTdT	2706
AD-61983.1	CAACUGCCUAUGCUUUCAdTdT	2140	3779-3797	AGUAAAGCAUAGGCAGUUGdTdT	2707
AD-61989.1	CUUUACUCACCAGUCUGAAAdTdT	2141	3791-3809	UUCAGACUGGUGAGUAAAGdTdT	2708
AD-61995.1	GUCUGAACUUGAAAGAUAdTdT	2142	3803-3821	AUAUCUUUCAAGUUCAGACdTdT	2709
AD-62001.1	ACUUGAAAGAUUAAAUAAdTdT	2143	3809-3827	UAAUUUAUUCUUUCAAGUdTdT	2710
AD-62007.1	UAUAAAUAUGUUAACCCAdTdT	2144	3819-3837	UGGGUUAACAUAUUUAUAdTdT	2711
AD-62013.1	GUUAACCCAGUCAUCAAUdTdT	2145	3829-3847	AUUUGAUGACUGGGUUAACdTdT	2712
AD-61972.1	JCAUCAAAUGGCUAUCAGAdTdT	2146	3839-3857	UCUGAUAGCCAUUUGAUGAdTdT	2713
AD-61978.1	UAUCAGAAGAGCAGAGGUAdTdT	2147	3851-3869	UACCUCUGCUUCUCUGAUAdTdT	2714
AD-61984.1	AGAGGUUAUGGAGGUGGUUdTdT	2148	3863-3881	AAGCCACCUCCAUAUCCUdTdT	2715
AD-61990.1	GAGGUGGUUUUAUUAACdTdT	2149	3872-3890	GUUGAAUAAAAGCCACCUCdTdT	2716
AD-61996.1	JAUUCAACCCAGGACACAAdTdT	2150	3883-3901	UUGUGUCCUGGUUGAAUAdTdT	2717
AD-62002.1	AGGACACAUAUUAUUAUdTdT	2151	3893-3911	AUGGCAUUGAUUGUCCUdTdT	2718
AD-62008.1	CAAUCAUUGCCAUUGAGGdTdT	2152	3899-3917	CCCUCAAUGGCAUUGAUUGdTdT	2719
AD-62014.1	CAUUGAGGGCCUGACGGAAAdTdT	2153	3909-3927	UUCCGUCAGGCCUCAUUGdTdT	2720
AD-61973.1	ACGGAAUAUUCACUCCUGGdTdT	2154	3922-3940	CCAGGAGUGAAUUAUCCGUdTdT	2721
AD-61979.1	JUCACUCCUGGUUAAACAAdTdT	2155	3930-3948	UUGUUUAACCAGGAGUAAAdTdT	2722
AD-61985.1	GGUUAAACAACUCCGUUGdTdT	2156	3939-3957	CAAGCGGAGUUGUUUAACdTdT	2723
AD-61991.1	CCGCUUGAGUAUGGACAUCdTdT	2157	3951-3969	GAUGUCCAUAUCAAGCGGdTdT	2724
AD-61997.1	GGCAUCGAUGUUUCUACdTdT	2158	3963-3981	GUAAGAAACAUCGAUGUCCdTdT	2725
AD-62003.1	CGAUGUUUCUUAACAGAUdTdT	2159	3969-3987	AUGCUUGUAAGAAACAUCGdTdT	2726
AD-62009.1	CAAGCAUAAAAGGUGCCUAdTdT	2160	3981-3999	UAAGGCACCUUUAUGCUUGdTdT	2727
AD-62056.1	GUGCCUUAUUAUUAUAdTdT	2161	3992-4010	UUAUAAUUAUGUAAAGCACdTdT	2728
AD-62015.1	ACAUAUUUAUAAAUGACAdTdT	2162	3999-4017	UGUCAUUUAUUAUUAUGdTdT	2729
AD-62021.1	AAAAUGACAGACAAGAAUdTdT	2163	4009-4027	AAUUCUUGUCUGCAUUUdTdT	2730
AD-62027.1	CAAGAAUUCCUUGGGAGGdTdT	2164	4020-4038	CCUCCCAAGGAAUUCUUGdTdT	2731
AD-62033.1	CCUUGGGAGGCCAGUAGAGdTdT	2165	4029-4047	CUCUACUGGCCUCCCAAGGdTdT	2732
AD-62039.1	AGUAGAGGUGCUUCUAAUdTdT	2166	4041-4059	AUUGAGAAGCACCUCUACUdTdT	2733
AD-62045.1	CUUCUCAUUGAUGACCUCAdTdT	2167	4051-4069	UGAGGUCAUCAUUGAGAAGdTdT	2734
AD-62051.1	UGACCUCAUUGUCAGUACAdTdT	2168	4062-4080	UGUACUGACAUGAGGUACdTdT	2735
AD-62057.1	GUCAGUACAGGAUUUGCAdTdT	2169	4072-4090	UGCCAAAUCUGUACUGACdTdT	2736
AD-62016.1	AGGAUUUGGCAGUGGUUGdTdT	2170	4080-4098	CAAGCCACUGCCAAUCCUdTdT	2737
AD-62022.1	UGGUUGGCUACAGUACAUdTdT	2171	4092-4110	AUGUACUGUAGCCAAGCCAdTdT	2738
AD-62028.1	GCUACAGUACAUUAACAAdTdT	2172	4099-4117	UUGUUACAUGUACUGUAGCAdTdT	2739
AD-62034.1	AACAACUGUAGUUCACAAAdTdT	2173	4113-4131	UUUGUGAACUACAGUUGUdTdT	2740
AD-62040.1	GUAGUUCACAAAACAGUAdTdT	2174	4120-4138	UACUGGUUUUGAUAUCAdTdT	2741

AD-62046.1	AAACCAGUACCUCUGAGGAdTdT	2175	4130-4148	UCCUCAGAGGUACUGGUUdTdT	2742
AD-62052.1	UGAGGAAGUUUGCAGCUUdTdT	2176	4143-4161	AAAGCUGCAAACUCCUCAdTdT	2743
AD-62058.1	UGCAGCUUUUUUUUGAAAAdTdT	2177	4153-4171	UUUUCAAAUAAGCUGCAdTdT	2744
AD-62017.1	AUUUGAAAUCGAUACUAdTdT	2178	4163-4181	UGAGUAUCGAUUUUCAAAdTdT	2745
AD-62023.1	CGAUACUCAGGAUUGAAAdTdT	2179	4173-4191	UUCAAUAUCCUGAGUAUCGdTdT	2746
AD-62029.1	GGAUUUGAAGCAUCCACdTdT	2180	4182-4200	GUGGGAUGCUCAAUAUCCdTdT	2747
AD-62035.1	GAAGCAUCCACUACAGAGdTdT	2181	4189-4207	CUCUGUAGUGGGAUGCUUCdTdT	2748
AD-62041.1	ACUACAGAGGCUACGGAAAdTdT	2182	4199-4217	UUUCCGUAGCCUCUGUAGdTdT	2749
AD-62047.1	CGGAAACUCUGAUUACAAAdTdT	2183	4212-4230	UUUGUAAUCAGAGUUCCGdTdT	2750
AD-62053.1	UGAUUACAACCGAUAGUAdTdT	2184	4221-4239	UACUAUGCGUUUGUAUCAdTdT	2751
AD-62059.1	GCAUAGUAGCAUGGCCAGdTdT	2185	4232-4250	CUGGCACAUGCUACUAUGCdTdT	2752
AD-62018.1	GCAUGGCCAGCUACAAGCdTdT	2186	4240-4258	GCUUGUAGCUGGCACAUGCdTdT	2753
AD-62024.1	CUACAAGCCCAGCAGGAAAdTdT	2187	4251-4269	UUCCUGCUGGGCUUGUAGdTdT	2754
AD-62030.1	CAGCAGGGAAGAAUCAAdTdT	2188	4260-4278	UGAUGAUUCUCCUGCUGdTdT	2755
AD-62036.1	GAAUCAUCAUCUGGAUCCdTdT	2189	4270-4288	AGGAUCCAGAUGAUGAUCCdTdT	2756
AD-62042.1	GAUCCUCUCAUGCGGUAUdTdT	2190	4283-4301	AUCACCUGAGAGGUAUCdTdT	2757
AD-62048.1	CUC AUGCGGUAUGGACAAdTdT	2191	4289-4307	AUGUCCAUCACCGCAUGAGdTdT	2758
AD-62054.1	GAUGGACAUCUCCUUGCCUdTdT	2192	4299-4317	AGGCAAGGAGAUUGCCAUCdTdT	2759
AD-62060.1	CUUGCCUACUGGAUACAGUdTdT	2193	4311-4329	ACUGAUUCCAGUAGGCAAGdTdT	2760
AD-62019.1	GAAUCAGUGCAAUAGAGAdTdT	2194	4322-4340	UCUUAUUUGCAGUAUUCdTdT	2761
AD-62025.1	AAAUGAAGAAGACUUAAAAdTdT	2195	4332-4350	UUUUUAGUCUUUUAUUUdTdT	2762
AD-62031.1	GAAGACUUAAAAGCCUUGdTdT	2196	4339-4357	CAAGGGCUUUUAGUCUUCdTdT	2763
AD-62037.1	CCUUGUGGAGGGGUGGAUdTdT	2197	4353-4371	AUCCACCCUCCACAAGGdTdT	2764
AD-62043.1	GAAGGGUGGUAUACUAUdTdT	2198	4360-4378	AUAGUUGAUCCACCCUUCdTdT	2765
AD-62049.1	AUCAACUAUUCACUGAUAdTdT	2199	4370-4388	UAAUCAGUGAAUAGUUGAdTdT	2766
AD-62055.1	CACUGAUUACCAAUAAdTdT	2200	4380-4398	UUUGAUUUGUAUACAGUGdTdT	2767
AD-62061.1	AUCAAGAUGGACAUGUAdTdT	2201	4393-4411	UACAUGUCCAUCUUUGAdTdT	2768
AD-62020.1	GGACAUGUUUUCUGCAACdTdT	2202	4402-4420	GUUGCAGAAUAACAUUCdTdT	2769
AD-62026.1	UCUGCAUCUGAAUUCGAUdTdT	2203	4413-4431	AAUCGAAUUCAGUUCGAGdTdT	2770
AD-62032.1	GAAUUCGAUUCUCCUAGUdTdT	2204	4422-4440	ACUGGAGGGAUUCGAAUUCdTdT	2771
AD-62038.1	CCCUCAGUGAUUCCUUUdTdT	2205	4432-4450	AAAGGAAUUCACUGGAGGdTdT	2772
AD-62044.1	GAUUUCCUUUGUGUACGAUdTdT	2206	4441-4459	AUCGUACACAAAGGAAUUCdTdT	2773
AD-62050.1	GUACGAUUCGGAUUUUGdTdT	2207	4453-4471	CAAAUAUCCGGAUUCGUACdTdT	2774
AD-62320.1	CGGAUUAUUGAACUUUGdTdT	2208	4462-4480	CAAAGAUUCAAAUAUCCGdTdT	2775
AD-62326.1	ACUCUUUGAAGUUGGUUdTdT	2209	4473-4491	AAACCCAAUCUCAAAGAdTdT	2776
AD-62332.1	AGUUGGUUUUCAGUCCUdTdT	2210	4482-4500	AGGACUGAGAAACCCAUCdTdT	2777
AD-62338.1	UUCUCAGUCCUGCCAUUdTdT	2211	4490-4508	AAAGUGGAGGACUGAGAdTdT	2778
AD-62344.1	CACUUUCAGUGUACGAAAdTdT	2212	4503-4521	UUCGUACACUGAGAAUGdTdT	2779
AD-62350.1	CACAGUGUACGAAUACAdTdT	2213	4509-4527	GUGGUUUCGUACAGUGdTdT	2780
AD-62356.1	ACCACAGACCAGAUAAAdTdT	2214	4523-4541	UGUUUAUCUGGUCUGUGdTdT	2781
AD-62362.1	CCAGAUAAACAGUUAAdTdT	2215	4531-4549	UGGUACACUGUUUAUCUGdTdT	2782
AD-62321.1	CAGUGUACCAUGUUUAUAdTdT	2216	4540-4558	UAUAAAACAUGGUACACUGdTdT	2783
AD-62327.1	GUUUUAUAGCACUUCAAAdTdT	2217	4551-4569	AUUGGAAGUGCUAUAACAdTdT	2784
AD-62333.1	CUUCAAUAUCAAUAUCAdTdT	2218	4562-4580	UGAAUUUUGAUUUGGAGdTdT	2785

AD-62339.1	AUCAAAAUUCAGAAAAGUCUdTdT	2219	4570-4588	AGACUUUCUGAAUUUUGAUdTdT	2786
AD-62345.1	GAAAGUCUGUGAAGGAGCCdTdT	2220	4581-4599	GGCUCCUUCACAGACUUUCdTdT	2787
AD-62351.1	GAAGGAGCCGCGUGCAAGUdTdT	2221	4591-4609	ACUUGCACGGCCUCCUUCdTdT	2788
AD-62357.1	CGUGCAAGUGUGUAGAAGCdTdT	2222	4601-4619	GCUUCUACACACUUGCACGdTdT	2789
AD-62363.1	SUAGAAGCUGAUUGUGGCdTdT	2223	4612-4630	GCCCACAAUCAGCUUCUACdTdT	2790
AD-62322.1	CUGAUUGUGGCAAUGCdTdT	2224	4619-4637	UGCAUUUGCCCAACUACGdTdT	2791
AD-62328.1	GCAAUUGCAGGAAGAUUGdTdT	2225	4629-4647	CAAUUCUUCUGCAUUUGCdTdT	2792
AD-62334.1	GAAGAAUUGGUAUCGACAAdTdT	2226	4639-4657	UUGUCAGAUCCAAUUCUUCdTdT	2793
AD-62340.1	CUGACAAUCUCUGCAGAGdTdT	2227	4651-4669	UCUCUGCAGAGAUUGUCAGdTdT	2794
AD-62346.1	GCAGAGACAAGAAAACAAAdTdT	2228	4663-4681	UUUGUUUCUUGUCUCUGCdTdT	2795
AD-62352.1	CAAGAAAACAAACAGCAUGdTdT	2229	4670-4688	CAUGCUGUUUUUUUCUUGdTdT	2796
AD-62358.1	ACAGCAUGUAAACCAGAGdTdT	2230	4681-4699	UCUCUGUUUACAUGCUGdTdT	2797
AD-62364.1	CCAGAGAUUGCAUAUGCUUdTdT	2231	4693-4711	AAGCAUAUGCAAUCUCUGGdTdT	2798
AD-62323.1	GCAUAUGCUUUAUAAAGUAdTdT	2232	4702-4720	UAACUUUAUAAGCAUAUUGCdTdT	2799
AD-62329.1	UUUAUAAAGUUAGCAUCAdTdT	2233	4710-4728	UGUGAUGCUAACUUUAUAdTdT	2800
AD-62335.1	CAUCACAUCUACUCUGUAdTdT	2234	4722-4740	UACAGUGAUGGAUGUGAUGdTdT	2801
AD-62341.1	UCACUGUAGAAAUGUUUdTdT	2235	4733-4751	AAAACAUUUUCUACAGUGAdTdT	2802
AD-62347.1	AGAAAAGUUUUUGUCAAGdTdT	2236	4740-4758	CUUGACAAAACAUAUUUCdTdT	2803
AD-62353.1	JUUGUCAAGUACAAGGCAAdTdT	2237	4750-4768	UUGCCUUGUACUUGACAAAdTdT	2804
AD-62359.1	AGGCAACCCUUCUGGAUAdTdT	2238	4763-4781	AUAUCCAGAGGGUUGCCUdTdT	2805
AD-62365.1	CCUUCUGGAUAUCUACAAAdTdT	2239	4770-4788	UUUGUAGAUUCCAGAAGGdTdT	2806
AD-62324.1	JAUUCUACAAAACUGGGAAAdTdT	2240	4779-4797	UUCCCCAGUUUUGUAGAUAdTdT	2807
AD-62330.1	CUGGGGAAGCUGUUGCUGAdTdT	2241	4790-4808	UCAGCAACAGCUUCCCCAGdTdT	2808
AD-62336.1	CUGUUGCUGAGAAAGACUCdTdT	2242	4799-4817	GAGUCUUUCAGCAACAGdTdT	2809
AD-62342.1	GACUCUGAGAUUACCUUCAdTdT	2243	4813-4831	UGAAGGUAUUCUCAGAGUCdTdT	2810
AD-62348.1	GAGAUUACCUUCAUUAAAAdTdT	2244	4819-4837	UUUUUAUGAAGGUAAUCUCdTdT	2811
AD-62354.1	AUUAAAAGGUAAACCUUAdTdT	2245	4831-4849	UACAGGUUACCUUUUAUAdTdT	2812
AD-62360.1	UAACCUUACUAAACGUGAdTdT	2246	4841-4859	UCAGCGUUAGUACAGGUAdTdT	2813
AD-62366.1	CUAACGUCAGCUGGUAAAdTdT	2247	4850-4868	UUUACCAGCUCAGCGUUAGdTdT	2814
AD-62325.1	GGUAAAAGGAAGACAGUACdTdT	2248	4863-4881	GUACUGUCUUCUUUUUACGdTdT	2815
AD-62331.1	GAAGACAGUACUUAAUUAUdTdT	2249	4871-4889	AUAAUUAAAGUACUGUCUUCdTdT	2816
AD-62337.1	CUUAAUUUGGGUAAAGAAAdTdT	2250	4881-4899	UUCUUUACCCAUAUUUAGdTdT	2817
AD-62343.1	JAAAGAAGCCUCCAGAUAdTdT	2251	4893-4911	UAUCUGGAGGGCUUCUUAdTdT	2818
AD-62349.1	CCUCCAGAUAAAUAACAAUdTdT	2252	4902-4920	AUUGUAUUUAUCUGGAGGdTdT	2819
AD-62355.1	AAAUACAAUUUCAGUUUCAdTdT	2253	4912-4930	UGAAACUGAAAUGUAUUUdTdT	2820
AD-62361.1	CAGUUUCAGGUACAUCUACdTdT	2254	4923-4941	GUAGAUGUACCUGAAACUGdTdT	2821
AD-62367.1	GGUACAUCUACCCUUAGAdTdT	2255	4931-4949	UCUAAAGGGUAGAUGUACCDdTdT	2822
AD-62373.1	CCUUUAGAUUCCUUGACCUdTdT	2256	4942-4960	AGGUCAAGGAAUCUAAAGGdTdT	2823
AD-62379.1	CCUUGACCUGGAUUGAAUAdTdT	2257	4952-4970	UAUUCAAUCCAGGUCAAGGdTdT	2824
AD-62385.1	GGAUUGAAUACUGGCCUAGdTdT	2258	4961-4979	CUAGGCCAGUAUUCAAUCCdTdT	2825
AD-62391.1	CUGGCCUAGAGACACAACAdTdT	2259	4971-4989	UGUUGUGUCUCUAGGCCAGdTdT	2826
AD-62397.1	GAGACACAACAUUGUUAUCdTdT	2260	4979-4997	GAUGAACAUUGUGUCUCdTdT	2827
AD-62403.1	GUUCAUCGUGUCAAGCAUdTdT	2261	4991-5009	AAUGCUUGACACGAUGAACdTdT	2828
AD-62409.1	GUCAAGCAUUUUUAGCUAAdTdT	2262	5000-5018	UUAGCUAAAAUAGCUUGACdTdT	2829

AD-62368.1	AGCUAAUUUAGAUAAUUUdTdT	2263	5013-5031	AAAUUCAUCUAAAUUAGCUdTdT	2830
AD-62374.1	AGAUGAAUUUGCCGAAGAUdTdT	2264	5022-5040	AUCUUCGGCAAUUUCAUCUdTdT	2831
AD-62380.1	CCGAAGAUUUCUUUUUAAAdTdT	2265	5033-5051	UUUAAAAAGAUUUCUUCGGdTdT	2832
AD-62386.1	CUUUUUAAAUGGAUGCUAAAdTdT	2266	5043-5061	UUAGCAUCCAUUUAAAAGdTdT	2833
AD-62392.1	GGAUGCUAAAUCUGAAAdTdT	2267	5053-5071	UUCAGGAAUUUAGCAUCCdTdT	2834
AD-62398.1	JAAAAUCCUGAAGUUCAGdTdT	2268	5059-5077	CUGAACUUCAGGAAUUUAdTdT	2835
AD-62404.1	AGUUCAGCUGCAUACAGUdTdT	2269	5071-5089	AACUGUAUGCAGCUGAACUdTdT	2836
AD-62410.1	GCAUACAGUUUGCACUUAUdTdT	2270	5080-5098	AUAAGUGCAAACUGUAUUCdTdT	2837
AD-62369.1	ACUUUAGGACUCCUGUUGdTdT	2271	5093-5111	ACAACAGGAGUCCAUUAGdTdT	2838
AD-62375.1	GGACUCCUGUUGUAGAUGdTdT	2272	5099-5117	ACUUCAACAACAGGAGUCCdTdT	2839
AD-62381.1	UGUUGAAGUUCGUUUUUUdTdT	2273	5109-5127	AAAAAACGAACUUCACAdTdT	2840
AD-62387.1	UUUUUUGUUUCUUCUUUdTdT	2274	5122-5140	AAAAGAAGAAAACAAAAAdTdT	2841
AD-62393.1	UCUUUUUUUUAAAACAUdTdT	2275	5132-5150	AAUGUUUAAAAAAGAAGdTdT	2842
AD-62399.1	UUUUUAAAACAUUCAUAGCAdTdT	2276	5139-5157	AGCUAUGAAUGUUUAAAAAdTdT	2843
AD-62405.1	AUAGCUGGUCUUAUUUGAdTdT	2277	5152-5170	UACAAAUAAGACCAGCUAUdTdT	2844
AD-62411.1	GUCUUUUUGUAAAGCUCAdTdT	2278	5159-5177	UGAGCUUUACAAAUAAGACdTdT	2845
AD-62370.1	AAAGCUCACUUUACUAGAdTdT	2279	5170-5188	UCUAAGUAAAGUGAGCUUdTdT	2846
AD-62376.1	ACUUAGAAUUGAGGCACUdTdT	2280	5182-5200	AGUGCCACUAAUUCUAGUdTdT	2847
AD-62382.1	AGUGGCACUUGCUUUUAUdTdT	2281	5192-5210	AAUAAAAGCAAGUGCCACUdTdT	2848
AD-62388.1	GCUUUUAUAGAGAAUGAdTdT	2282	5202-5220	AUCAUUCUCUAAUAAAAGCAdTdT	2849
AD-62394.1	GAGAAUGAUUUCAAUGCAdTdT	2283	5212-5230	AGCAUUUGAAAUCUUCUdTdT	2850
AD-62400.1	JUUCAAUUGCUGUAACUUdTdT	2284	5220-5238	AAAGUUACAGCAUUUGAAAdTdT	2851
AD-62406.1	GUAACUUUCGAAAUAACAdTdT	2285	5231-5249	UGUUAUUUCAGAAAGUUACdTdT	2852
AD-62412.1	GAAUAACAUGGCCUUGGAdTdT	2286	5241-5259	UCCAAGGCCAUGUUUUUCdTdT	2853
AD-62371.1	CCUUGGAGGGCAUGAAGAdTdT	2287	5253-5271	GUCUUCUUGCCUCCAAGGdTdT	2854
AD-62377.1	AGGGAUGAAGACAGAUACdTdT	2288	5259-5277	GUAUCUGUCUUCUUGCCUdTdT	2855
AD-62383.1	GAUACUCCUCCAAGGUUAUdTdT	2289	5273-5291	AUAACCUUGGAGGAGUAUCdTdT	2856
AD-62389.1	CCUCCAAGGUUAUUGGACAdTdT	2290	5279-5297	UGUCCAUAUACCUUGGAGGdTdT	2857
AD-62395.1	GGACACCGGAACAUAUAdTdT	2291	5293-5311	UUUAUUGUUCCGGUGUCCdTdT	2858
AD-62401.1	GAAACAUAUUUUGGAACAdTdT	2292	5301-5319	UGUCCAUAUUUUGUUUCdTdT	2859
AD-62407.1	AUUGGAACACCUCUCAAAAdTdT	2293	5311-5329	UUUGAGGAGGUGUCCAUAUdTdT	2860
AD-62413.1	JCCUCAAACCUACCACUCAdTdT	2294	5322-5340	UGAGUGGUAGGUUUGAGAdTdT	2861
AD-62372.1	CUACCACUCAGGAAUGUUdTdT	2295	5331-5349	AAACAUUCCUGAGUGGUAGdTdT	2862
AD-62378.1	AAUGUUUGCUGGGCCGAAdTdT	2296	5343-5361	UUCGGCCCCAGCAACAUUdTdT	2863
AD-62384.1	JGUGGGGGCCGAAAGACAdTdT	2297	5349-5367	UGUUCUUUCGGCCCCAGCAdTdT	2864
AD-62390.1	AAAGAACAGUCCAUGAAAdTdT	2298	5360-5378	UUUCAUUGGACUGUUCUUdTdT	2865
AD-62396.1	CAUUGAAAGGAGUAUUCAdTdT	2299	5371-5389	GUAUAUCUCCUUUCAUUGdTdT	2866
AD-62402.1	GGAGUUUACAAAAACUAdTdT	2300	5380-5398	CAUGUUUUUGAAUACUCCdTdT	2867
AD-62408.1	AAAACAUGGCCUUUGCUUGdTdT	2301	5391-5409	CAAGCAAAGGCCAUGUUUdTdT	2868
AD-62414.1	GCCUUUGCUUGAAAGAAAAdTdT	2302	5399-5417	UUUUCUUUCAAGCAAAGGCdTdT	2869
AD-62415.1	GAAAGAAAUAACCAAGGAAdTdT	2303	5409-5427	UUCCUUGGUUUUUUUUCdTdT	2870
AD-62416.1	CCAAGGAACAGGAAACUGAdTdT	2304	5420-5438	UCAGUUUCCUGUUCCUUGGdTdT	2871
AD-62417.1	AACUGAUCAUUAAAGCCUGdTdT	2305	5433-5451	CAGGCUUUAAUGAUCAGUdTdT	2872

Таблица 22
Тест разовой дозы С5 (10 мМ) в клетках
Нер3В с dT-модифицированными иРНК

ID дуплекса	Avg. % оставшегося количества транскрипта
AD-61779.2	43,2
AD-61785.2	22,5
AD-61791.2	27,3
AD-61797.2	30,5
AD-61803.2	30,9
AD-61809.2	75,1
AD-61815.2	90,7
AD-61821.2	33,7
AD-61780.2	53,5
AD-61786.2	34,4
AD-61792.2	27,5
AD-61798.2	23,3
AD-61804.2	23,6
AD-61810.2	33,4
AD-61816.2	39,7
AD-61822.2	24,9
AD-61781.2	31,2
AD-61787.2	22,8
AD-61793.2	28,4
AD-61799.2	91
AD-61805.2	22,1
AD-61811.2	90,9
AD-61817.2	26,1
AD-61823.2	41,3
AD-61782.2	42,5
AD-61788.2	28,9
AD-61794.2	133,5

044245

AD-61800.2	27,9
AD-61806.2	42,8
AD-61812.2	26,9
AD-61818.2	30,6
AD-61824.2	29,3
AD-61783.2	61,3
AD-61789.2	25,5
AD-61795.2	34,2
AD-61801.2	24,2
AD-61807.2	42,8
AD-61813.2	31
AD-61819.2	42,2
AD-61825.2	31
AD-61784.2	34,1
AD-61790.2	26,8
AD-61796.2	34,6
AD-61802.2	30
AD-61808.2	23,5
AD-61814.2	45,3
AD-61820.2	56
AD-61826.2	31,6
AD-61832.2	36,2
AD-61838.2	39,7
AD-61844.2	37
AD-61850.2	66,3
AD-61856.2	172,6
AD-61862.2	41,3
AD-61868.2	32,2
AD-61827.2	52,7
AD-61833.2	29,6
AD-61839.2	41,5
AD-61845.2	29,7

044245

AD-61851.2	37
AD-61857.2	34,9
AD-61863.2	33,3
AD-61869.2	38,2
AD-61828.2	30,3
AD-61834.2	27,1
AD-61840.2	64,3
AD-61846.2	42
AD-61852.2	25,2
AD-61858.2	96,7
AD-61864.2	29,6
AD-61870.2	30,5
AD-61829.2	92,7
AD-61835.2	24,8
AD-61841.2	59,2
AD-61847.2	30,9
AD-61853.2	35,2
AD-61859.2	40,1
AD-61865.2	42,3
AD-61871.2	55,8
AD-61830.2	162,9
AD-61836.2	28,8
AD-61842.2	18,2
AD-61848.2	25
AD-61854.2	42,3
AD-61860.2	41,7
AD-61866.2	28,9
AD-61872.2	64,7
AD-61831.2	16,9
AD-61837.2	24,9
AD-61843.2	27,5
AD-61849.2	25,8

044245

AD-61855.2	20
AD-61861.2	28,6
AD-61867.2	18
AD-62062.1	22
AD-62068.1	29,9
AD-62074.1	40,2
AD-62080.1	30,4
AD-62086.1	21
AD-62092.1	20
AD-62098.1	38,4
AD-62104.1	42,7
AD-62063.1	26,6
AD-62069.1	55,6
AD-62075.1	114,4
AD-62081.1	21,2
AD-62087.1	33,8
AD-62093.1	26,3
AD-62099.1	23,9
AD-62105.1	30,1
AD-62064.1	32
AD-62070.1	135,7
AD-62076.1	84,3
AD-62082.1	42,3
AD-62088.1	36,5
AD-62094.1	66
AD-62100.1	66,4
AD-62106.1	33,9
AD-62065.1	33
AD-62071.1	38,4
AD-62077.1	27,8
AD-62083.1	44,7
AD-62089.1	42,7

044245

AD-62095.1	46,6
AD-62101.1	35,3
AD-62107.1	29,9
AD-62066.1	33,5
AD-62072.1	27,5
AD-62078.1	49,9
AD-62084.1	117,6
AD-62090.1	44
AD-62096.1	33,5
AD-62102.1	39,2
AD-62108.1	69,5
AD-62067.1	32,3
AD-62073.1	81,1
AD-62079.1	46,8
AD-62085.1	31,6
AD-62091.1	32
AD-62097.1	35,3
AD-62103.1	35,6
AD-62109.1	24,7
AD-62115.1	25,7
AD-62121.1	23,1
AD-62127.1	36,3
AD-62133.1	50,9
AD-62139.1	84,1
AD-62145.1	90,8
AD-62151.1	56,9
AD-62110.1	26
AD-62116.1	145,5
AD-62122.1	198,7
AD-62128.1	178,4
AD-62134.1	52,4
AD-62140.1	55,6

044245

AD-62146.1	47,2
AD-62152.1	16,4
AD-62111.1	49,3
AD-62117.1	46,2
AD-62123.1	95,1
AD-62129.1	156,2
AD-62135.1	62
AD-62141.1	128,1
AD-62147.1	146,2
AD-62153.1	35,5
AD-62112.1	43
AD-62118.1	32
AD-62124.1	48,4
AD-62130.1	49,4
AD-62136.1	141,9
AD-62142.1	38,7
AD-62148.1	165,2
AD-62154.1	94,7
AD-62113.1	52,5
AD-62119.1	44
AD-62125.1	129,9
AD-62131.1	68,9
AD-62137.1	106
AD-62143.1	176,1
AD-62149.1	201,3
AD-62155.1	143,3
AD-62114.1	22,8
AD-62120.1	34,6
AD-62126.1	44,6
AD-62132.1	39,5
AD-62138.1	34,5
AD-62144.1	28

044245

AD-62150.1	22,1
AD-62156.1	44,1
AD-62162.1	19,8
AD-62168.1	17,3
AD-62174.1	27
AD-62180.1	15,8
AD-62186.1	20,5
AD-62192.1	33,9
AD-62198.1	14
AD-62157.1	19,3
AD-62163.1	15,4
AD-62169.1	23,6
AD-62175.1	29,6
AD-62181.1	26,4
AD-62187.1	28,8
AD-62193.1	22,9
AD-62199.1	16,4
AD-62158.1	18,5
AD-62164.1	19,1
AD-62170.1	15
AD-62176.1	62,7
AD-62182.1	70,8
AD-62188.1	81,1
AD-62194.1	63,6
AD-62200.1	21,6
AD-62159.1	42,8
AD-62165.1	27,7
AD-62171.1	31,9
AD-62177.1	29,6
AD-62183.1	25,2
AD-62189.1	32,7
AD-62195.1	73,1

044245

AD-62201.1	35,6
AD-62160.1	56,5
AD-62166.1	115,1
AD-62172.1	107,4
AD-62178.1	71,3
AD-62184.1	27,2
AD-62190.1	37,2
AD-62196.1	19,5
AD-62202.1	19,4
AD-62161.1	23,7
AD-62167.1	24,4
AD-62173.1	36
AD-62179.1	50,5
AD-62185.1	40,5
AD-62191.1	39,3
AD-62197.1	39,4
AD-62203.1	34,1
AD-62209.1	34,6
AD-62215.1	31
AD-62221.1	16,3
AD-62227.1	68,5
AD-62233.1	34,3
AD-62239.1	37,2
AD-62245.1	31,2
AD-62204.1	33
AD-62210.1	29
AD-62216.1	38,7
AD-62222.1	34,5
AD-62228.1	30,3
AD-62234.1	15,2
AD-62240.1	26,2
AD-62246.1	40,4

044245

AD-62205.1	17,1
AD-62211.1	20,9
AD-62217.1	49,8
AD-62223.1	40
AD-62229.1	26,7
AD-62235.1	21,5
AD-62241.1	46,2
AD-62247.1	40,4
AD-62206.1	42,2
AD-62212.1	51,7
AD-62218.1	26
AD-62224.1	40,3
AD-62230.1	32,8
AD-62236.1	52,4
AD-62242.1	33,1
AD-62248.1	18
AD-62207.1	19,7
AD-62213.1	43,4
AD-62219.1	39,8
AD-62225.1	34,3
AD-62231.1	37,2
AD-62237.1	25,9
AD-62243.1	19,8
AD-62249.1	13,8
AD-62208.1	13,7
AD-62214.1	16,6
AD-62220.1	25,2
AD-62226.1	27
AD-62232.1	36,5
AD-62238.1	51,5
AD-62244.1	31,5
AD-61874.1	27,1

044245

AD-61880.1	30,8
AD-61886.1	30,4
AD-61892.1	48,9
AD-61898.1	24,7
AD-61904.1	125,9
AD-61910.1	45,7
AD-61916.1	25,7
AD-61875.1	33,4
AD-61881.1	64
AD-61887.1	36,7
AD-61893.1	22,9
AD-61899.1	84,5
AD-61905.1	32,1
AD-61911.1	23,7
AD-61917.1	22,1
AD-61876.1	47,3
AD-61882.1	26,5
AD-61888.1	27,7
AD-61894.1	64,8
AD-61900.1	89,8
AD-61906.1	22,4
AD-61912.1	19,8
AD-61918.1	37,1
AD-61877.1	145
AD-61883.1	31,5
AD-61889.1	33,9
AD-61895.1	37,5
AD-61901.1	26,1
AD-61907.1	33
AD-61913.1	33,1
AD-61919.1	36,6
AD-61878.1	26,9

044245

AD-61884.1	33,9
AD-61890.1	37,2
AD-61896.1	41,7
AD-61902.1	58,6
AD-61908.1	28
AD-61914.1	31,4
AD-61920.1	27,1
AD-61879.1	33,1
AD-61885.1	33,7
AD-61891.1	41,3
AD-61897.1	39,4
AD-61903.1	51,5
AD-61909.1	48,6
AD-61915.1	122,4
AD-61921.1	66,4
AD-61927.1	40,5
AD-61933.1	27,7
AD-61939.1	28,1
AD-61945.1	30
AD-61951.1	33,7
AD-61957.1	32,6
AD-61963.1	17
AD-61922.1	32,9
AD-61928.1	28,3
AD-61934.1	24
AD-61940.1	28,2
AD-61946.1	33,2
AD-61952.1	167,9
AD-61958.1	37
AD-61964.1	30,6
AD-61923.1	51,2
AD-61929.1	29,4

044245

AD-61935.1	61
AD-61941.1	29,5
AD-61947.1	28,9
AD-61953.1	23,7
AD-61959.1	18,9
AD-61965.1	17
AD-61924.1	24,1
AD-61930.1	31,9
AD-61936.1	36,9
AD-61942.1	13,8
AD-61948.1	40,2
AD-61954.1	41,8
AD-61960.1	24,1
AD-61966.1	18,9
AD-61925.1	52,4
AD-61931.1	25,8
AD-61937.1	19,1
AD-61943.1	27,8
AD-61949.1	26,5
AD-61955.1	83,8
AD-61961.1	26
AD-61967.1	16,3
AD-61926.1	17,8
AD-61932.1	18,6
AD-61938.1	31,9
AD-61944.1	29,5
AD-61950.1	57,8
AD-61956.1	42,1
AD-61962.1	30
AD-61968.1	29,1
AD-61974.1	50,8
AD-61980.1	19,7

044245

AD-61986.1	36,4
AD-61992.1	36,3
AD-61998.1	18,3
AD-62004.1	14
AD-62010.1	56,8
AD-61969.1	30
AD-61975.1	51,1
AD-61981.1	37,6
AD-61987.1	32,5
AD-61993.1	23,4
AD-61999.1	43,8
AD-62005.1	23,8
AD-62011.1	32,7
AD-61970.1	39,6
AD-61976.1	27,5
AD-61982.1	64,9
AD-61988.1	29,5
AD-61994.1	40,5
AD-62006.1	42,1
AD-62012.1	21
AD-61971.1	27,1
AD-61977.1	23,4
AD-61983.1	57,5
AD-61989.1	25,8
AD-61995.1	18,2
AD-62001.1	29,7
AD-62007.1	106,4
AD-62013.1	36,1
AD-61972.1	40,5
AD-61978.1	49,1
AD-61984.1	24,3
AD-61990.1	38,8

044245

AD-61996.1	40,5
AD-62002.1	32,5
AD-62008.1	35,3
AD-62014.1	23,6
AD-61973.1	39,3
AD-61979.1	27,4
AD-61985.1	31,3
AD-61991.1	34,9
AD-61997.1	29,2
AD-62003.1	25,9
AD-62009.1	21,1
AD-62056.1	16,3
AD-62015.1	139,3
AD-62021.1	36,4
AD-62027.1	42,4
AD-62033.1	62
AD-62039.1	35,2
AD-62045.1	30,8
AD-62051.1	22,9
AD-62057.1	31,8
AD-62016.1	29,2
AD-62022.1	36,9
AD-62028.1	52,6
AD-62034.1	31
AD-62040.1	30,7
AD-62046.1	28,2
AD-62052.1	23,7
AD-62058.1	77,9
AD-62017.1	41
AD-62023.1	27
AD-62029.1	31,8
AD-62035.1	46,4

044245

AD-62041.1	25,3
AD-62047.1	20
AD-62053.1	37,1
AD-62059.1	31
AD-62018.1	37,8
AD-62024.1	34,7
AD-62030.1	50,4
AD-62036.1	25,5
AD-62042.1	32,5
AD-62048.1	28,3
AD-62054.1	55,6
AD-62060.1	26,9
AD-62019.1	29
AD-62025.1	78,5
AD-62031.1	152,8
AD-62037.1	27,3
AD-62043.1	33,8
AD-62049.1	46
AD-62055.1	24,5
AD-62061.1	30,5
AD-62020.1	25,1
AD-62026.1	24,9
AD-62032.1	23
AD-62038.1	21,2
AD-62044.1	34,1
AD-62050.1	22,4
AD-62320.1	16,6
AD-62326.1	16,6
AD-62332.1	15,4
AD-62338.1	41,9
AD-62344.1	19,6
AD-62350.1	32,3

044245

AD-62356.1	20,4
AD-62362.1	27,8
AD-62321.1	18,7
AD-62327.1	14,8
AD-62333.1	22,2
AD-62339.1	134,5
AD-62345.1	32,1
AD-62351.1	35,6
AD-62357.1	31
AD-62363.1	28,2
AD-62322.1	45,1
AD-62328.1	30,1
AD-62334.1	39,1
AD-62340.1	24,3
AD-62346.1	35,4
AD-62352.1	33,8
AD-62358.1	45,7
AD-62364.1	19,7
AD-62323.1	40,5
AD-62329.1	57,5
AD-62335.1	27,6
AD-62341.1	69,2
AD-62347.1	125,9
AD-62353.1	53,1
AD-62359.1	38,1
AD-62365.1	23,6
AD-62324.1	27,1
AD-62330.1	25,1
AD-62336.1	25,3
AD-62342.1	45,4
AD-62348.1	91,6
AD-62354.1	132,1

044245

AD-62360.1	31,6
AD-62366.1	14,2
AD-62325.1	27,9
AD-62331.1	31,5
AD-62337.1	33,9
AD-62343.1	36,1
AD-62349.1	37,6
AD-62355.1	38,8
AD-62361.1	46,1
AD-62367.1	23,6
AD-62373.1	32,1
AD-62379.1	29,6
AD-62385.1	35,7
AD-62391.1	33,7
AD-62397.1	54,1
AD-62403.1	34,8
AD-62409.1	28,2
AD-62368.1	29,7
AD-62374.1	29,6
AD-62380.1	30,6
AD-62386.1	23,4
AD-62392.1	30,5
AD-62398.1	48,7
AD-62404.1	24,8
AD-62410.1	21,9
AD-62369.1	27,4
AD-62375.1	31,9
AD-62381.1	27,3
AD-62387.1	77
AD-62393.1	93,3
AD-62399.1	150,2
AD-62405.1	28,5

AD-62411.1	19,4
AD-62370.1	16,3
AD-62376.1	48,2
AD-62382.1	28,5
AD-62388.1	49,9
AD-62394.1	29,9
AD-62400.1	45,2
AD-62406.1	23
AD-62412.1	45,5
AD-62371.1	66,5
AD-62377.1	49,5
AD-62383.1	73,8
AD-62389.1	82,4
AD-62395.1	31,8
AD-62401.1	31,2
AD-62407.1	30,2
AD-62413.1	28,1
AD-62372.1	43
AD-62378.1	17,9
AD-62384.1	29,6
AD-62390.1	37,7
AD-62396.1	26
AD-62402.1	31,6
AD-62408.1	46,6
AD-62414.1	27,2
AD-62415.1	17,6
AD-62416.1	25,3
AD-62417.1	36,3
AD-61779.2	43,2
AD-61785.2	22,5
AD-61791.2	27,3
AD-61797.2	30,5
AD-61803.2	30,9
AD-61809.2	75,1
AD-61815.2	90,7
AD-61821.2	33,7
AD-61780.2	53,5
AD-61786.2	34,4
AD-61792.2	27,5
AD-61798.2	23,3
AD-61804.2	23,6

Пример 7. Скрининг дополнительных siRNA *in vivo*.

На основании последовательности AD-58643, синтезировали дополнительные четыре смысловых и три антисмысловых последовательности и применяли их для получения двенадцати, 21/25mer соединений (табл. 23). В общем, антисмысловые цепи этих соединений были расширены посредством dTdT и дуплексы содержали меньше фтор-модифицированных нуклеотидов.

Мышам линии C57BL/6 (количество=3 на группу) подкожно вводили 1 мг/кг таких GalNAc-конъюгированных дуплексов, собирали сыворотку в день 0, предварительно отбирая, и на день 5 определяли количественно уровень белков C5 с помощью ELISA. Уровни белка C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке.

Табл. 14 показывает результаты теста разовой дозы *in vivo* с указанными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося белка C5 по отношению к уровням в предварительно отобранной сыворотке. Эти иРНК с улучшенной эффективностью по сравнению с исходным соединением включали AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651. Эти иРНК также демонстрировали подобную эффективность (IC₅₀ приблизительно 23-59 пМ).

Эффективность этих иРНК испытывали на мышах линии C57BL/6 с применением протокола введения разовой дозы. Мышам вводили подкожно AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651 в дозе 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг или 2,5 мг/кг. Сыворотку собирали в дни 0 и 5 и анализировали на уровень белка C5 с помощью ELISA. Уровни C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке.

На фиг. 15 показано наличие зависимости доза-ответ со всеми тестируемыми иРНК и что разовое введение всех этих иРНК приводит к сайленсингу белка C5, аналогичному или улучшенному по сравнению с AD-58641.

Продолжительность сайленсинга AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651 *in vivo* определяли путем введения разовой дозы 1,0 мг/кг мышам линии C57BL/6 и определением количества белка C5, обнаруживаемого в дни 6, 13, 20, 27 и 34 с помощью ELISA. Уровни C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке.

Как показано на фиг. 16, каждая из испытываемых иРНК демонстрирует ту же кинетику восстановления, что и AD-62643, с тенденцией к лучшему сайленсингу, но в пределах погрешности анализа.

AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651 дополнительно испытывали на эффективность и оценивали кумулятивный эффект иРНК у крыс с применением протокола повторных введений. Крысам линии Sprague Dawley дикого типа производили подкожную инъекцию с каждой из иРНК в дозе 5,0 мг/кг/дозу на день 0, 4 и 7. Сыворотку собирали на день 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25, 28 и 32. Гемолитическую активность сыворотки количественно оценивали, как описано выше.

Результаты, представленные на фиг. 17, показывают, что все из испытанных иРНК обеспечивают эффективное и продолжительное снижение гемолитической активности и аналогичное восстановление гемолиза, наблюдаемые при обработке AD-58641.

Таблица 23

Последовательности модифицированной смысловой и антисмысловой цепи GalNAc-конъюгированных dsRNA C5

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая (от 5' к 3')	SEQ ID NO:	AS ID	Антисмысловая (от 5' к 3')	SEQ ID NO:
AD-58643	A-119326.1	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2873	A-119327.1	usAfsuUfaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcUfusus	2886
AD-62642	A-125167.7	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2874	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT	2887
AD-62510	A-125167.7	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2875	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2888
AD-62643	A-125167.7	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2876	A-125647.1	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2889
AD-62644	A-125157.17	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2877	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2890
AD-62645	A-125157.17	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2878	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2891
AD-62646	A-125157.17	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2879	A-125647.1	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2892
AD-62647	A-125134.1	asasgcaagauaUfuuuua(Tgn) auaL96	2880	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2893
AD-62648	A-125134.1	asasgcaagauaUfuuuua(Tgn) auaL96	2881	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2894
AD-62649	A-125134.1	asasgcaagauaUfuuuua(Tgn) auaL96	2882	A-125647.1	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2895
AD-62428	A-125127.2	asasgcaagaUfaUfuuuuaaauaL96	2883	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2896
AD-62650	A-125127.2	asasgcaagaUfaUfuuuuaaauaL96	2884	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2897
AD-62651	A-125127.2	asasgcaagaUfaUfuuuuaaauaL96	2885	A-125647.1	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	2898

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство, представляющее собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где указанная dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок,

где смысловая цепь и антисмысловая цепь, каждая независимо, имеют длину 19-25 нуклеотидов,

смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGCAAGAUUUUUUAUAAUA-3' (SEQ ID NO:62) и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU-3' (SEQ ID NO:113),

все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи включают нуклеотидную модификацию и

по меньшей мере одна цепь конъюгируется с лигандом.

2. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.1, где по меньшей мере одна из указанных нуклеотидных модификаций выбрана из группы, состоящей из 3'-концевой дезокси-тимин (dT) нуклеотидной модификации, 2'-О-метил-нуклеотидной модификации, 2'-фтор-нуклеотидной модификации, 2'-дезоксинуклеотидной модификации, замкнутой нуклеотидной модификации, абазической нуклеотидной модификации, 2'-амино-нуклеотидной модификации, 2'-алкил-нуклеотидной модификации, морфолинонуклеотидной модификации, нуклеотидной модификации фосфорамидата, содержащего основание не природного происхождения, нуклеотида, содержащего модификацию 5'-фосфоротиоатной группы, и модификации концевого нуклеотида, связанного с холестерильным производным или группой бисдециламида додекановой кислоты.

3. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.2, где указанные модифицированные нуклеотиды содержат модификацию короткой последовательности 3'-концевых дезокси-тиминовых нуклеотидов (dT).

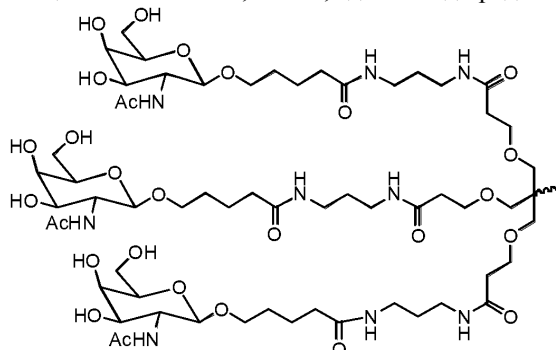
4. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-3, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 1 нуклеотида.

5. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-3, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 2 нуклеотидов.

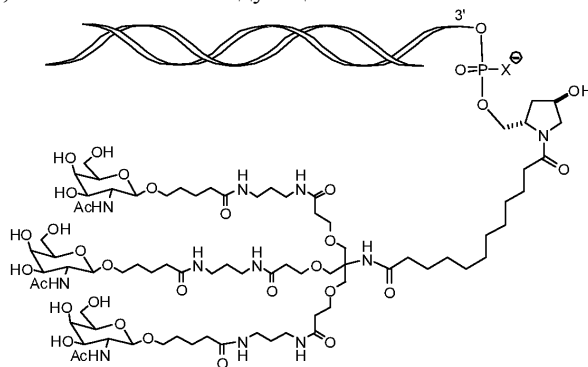
6. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-5, где лиганд конъюгируется с 3'-концом смысловой цепи средства, представляющего собой dsRNA.

7. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-6, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

8. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.7, где лиганд представляет собой



9. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.7, где средство, представляющее собой dsRNA, конъюгируется с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

10. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.9, где X представляет собой O.

11. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-10, где указанное средство, представляющее собой dsRNA, дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

12. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.11, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

13. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.12, где указанная цепь является антисмысловой цепью.

14. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.12, где указанная цепь является смысловой цепью.

15. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.11, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

16. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.15, где указанная цепь является антисмысловой цепью.

17. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.15, где указанная цепь является смысловой цепью.

18. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.11, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи.

19. Средство, представляющее собой dsRNA, по п.18, где указанная цепь является антисмысловой цепью.

20. Средство, представляющее собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA) для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где указанное средство dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок,

где смысловая цепь и антисмысловая цепь, каждая независимо, имеет длину 19-25 нуклеотидов,

смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGCAAGAUUUUUUAUAAUA-3' (SEQ ID NO:62), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU-3' (SEQ ID NO:113),

все нуклеотиды указанной смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

указанная смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

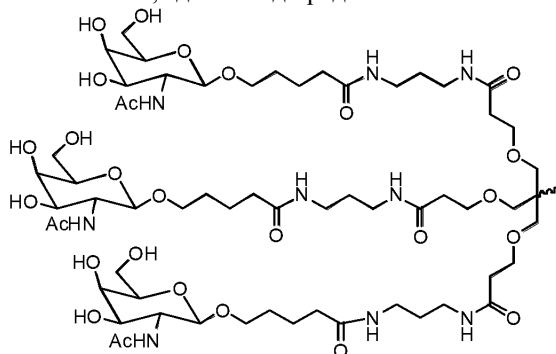
все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и модификации дезокси-тимин нуклеотида,

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

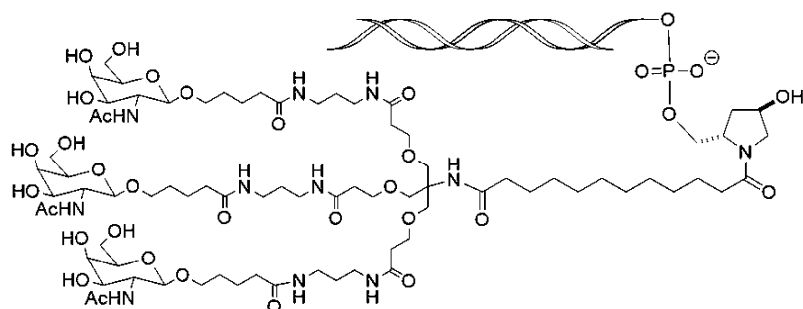
указанная смысловая цепь конъюгируется с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

21. Средство dsRNA по п.20, где одно или несколько производных GalNAc присоединены посредством трехвалентного разветвленного линкера.

22. Средство dsRNA по п.20 или 21, где лиганд представляет собой



23. Средство dsRNA по п.22, где средство RNAi конъюгируется с лигандом, как показано на следующей схеме:



24. Средство dsRNA по любому из пп.1-23, где двухцепочечный участок составляет в длину 19-25 пар нуклеотидов.

25. Средство dsRNA по п.24, где двухцепочечный участок составляет в длину 19-23 пары нуклеотидов.

26. Средство dsRNA по п.24, где двухцепочечный участок составляет в длину 19-21 пару нуклеотидов.

27. Средство dsRNA по п.24, где двухцепочечный участок составляет в длину 21-23 пары нуклеотидов.

28. Средство dsRNA по любому из пп.1-27, где каждая цепь независимо составляет в длину 21-23 нуклеотида.

29. Средство dsRNA по любому из пп.1-28, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-AAGCAAGAUUUUUUAUAAUA-3' (SEQ ID NO:62).

30. Средство dsRNA по любому из пп.1-29, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU-3' (SEQ ID NO:113).

31. Средство dsRNA по любому из пп.1-30, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-AAGCAAGAUUUUUUAUAAUA-3' (SEQ ID NO:62) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU-3' (SEQ ID NO:113).

32. Средство dsRNA по п.31, где смысловая цепь содержит 5'-asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua-3' (SEQ ID NO:2876) и антисмысловая цепь содержит 5'-usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT-3' (SEQ ID NO:2889),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, G, C и U; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U; dT представляет собой дезокси-тимин нуклеотид и s представляет собой фосфорианную связь.

33. Средство dsRNA по любому из пп.1-31, где смысловая и антисмысловая цепи содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

5' - AfaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAf - 3' (SEQ ID NO:122)

и

5' - uAfuUfaUfaAfaAfaUfcUfuGfcUfusUfsu - 3' (SEQ ID NO:173);

5' - AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAf - 3' (SEQ ID NO:164) и

5' - usAfsuUfaUfaAfaAfaUfcUfuGfcUfususu - 3' (SEQ ID NO:215);

5' - asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaUfa - 3' (SEQ ID NO:2875)

и

5' - usAfsUfuAfuAfAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT - 3' (SEQ ID NO:2888);

5' - asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaUfa - 3' (SEQ ID NO: 2876)

и

5' - usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT - 3' (SEQ ID NO:2889);

5' - asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaUfa - 3' (SEQ ID NO:2878)

и

5' - usAfsUfuAfuAfAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT - 3' (SEQ ID NO:2891);

5' - asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaUfa - 3' (SEQ ID NO:2879)

и

5' - usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT - 3' (SEQ ID NO:2892);

5' - asasgcaagaUfaUfuuuuaaaua - 3' (SEQ ID NO:2884) и

5' - usAfsUfuAfuAfAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT - 3' (SEQ ID NO:2897); и

5' - asasgcaagaUfaUfuuuuaaaua - 3' (SEQ ID NO:2885) и

5' - usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT - 3' (SEQ ID NO:2898),

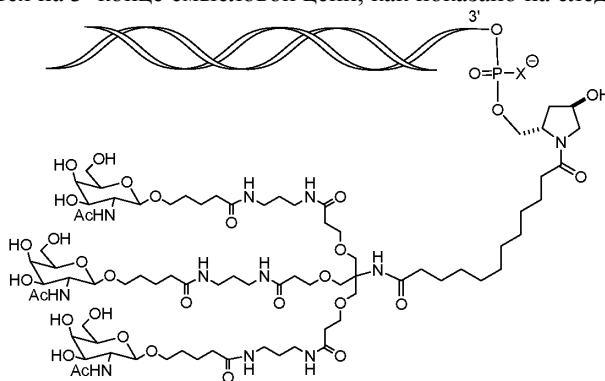
где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U; dT представляет собой дезокси-тимин нуклеотид и s представляет собой фосфориотатную связь.

34. Средство dsRNA по п.33,

где смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaUfa-3' (SEQ ID NO:2876) и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT-3' (SEQ ID NO:2889),

а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U; dT представляет собой дезокси-тимин нуклеотид и s представляет собой фосфориотатную связь; и

лиганд конъюгируется на 3'-конце смысловой цепи, как показано на следующей схеме:



35. Клетка, содержащая средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-34.
36. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента C5, содержащая средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп.1-34.
37. Фармацевтическая композиция по п.36, где средство RNAi содержится в небуферном растворе.
38. Фармацевтическая композиция по п.37, где указанный небуферный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.
39. Фармацевтическая композиция по п.38, где указанное средство RNAi присутствует с буферным раствором.
40. Фармацевтическая композиция по п.39, где указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.
41. Фармацевтическая композиция по п.39, где указанный буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).
42. Способ ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, включающий:
- (а) приведение клетки в контакт со средством dsRNA по любому из пп.1-34 или фармацевтической композицией по любому из пп.36-41 и
- (б) поддержание клетки, полученной на стадии (а) в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена компонента комплемента C5 с ингибированием тем самым экспрессии гена компонента комплемента C5 в клетке.
43. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, по любому из пп.1-34 или фармацевтической композиции по любому из пп.36-41 с лечением тем самым указанного субъекта.
44. Способ предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, причем способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, по любому из пп.1-34 или фармацевтической композиции по любому из пп.36-41 с предупреждением тем самым по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.
45. Способ по п.43 или 44, где введение dsRNA субъекту приводит к уменьшению внутрисосудистого гемолиза, стабилизации уровней гемоглобина и/или снижению белка C5.
46. Способ по п.43 или 44, где нарушение представляет собой заболевание, связанное с компонентом комплемента C5.
47. Способ по п.46, где заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, выбрано из группы, состоящей из ночной пароксизмальной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (RA), синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS), болезни плотного осадка (DDD), оптиконевромиелита (NMO), мультифокальной моторной нейропатии (MMN), рассеянного склероза (MS); дегенерации желтого пятна (например, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдрома, включающего гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP); пурпуры тромбоцитарной тромбоцитопенической (ТТР); спонтанной потери плода; пауци-иммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении гравис, болезни холодových агглютининов, дерматомиозита буллезного пемфигоида, связанного с Шига-подобным токсином E. coli гемолитико-уремического синдрома, С3-нефропатии, васкулита, связанного с антителами к цитоплазме нейтрофилов; реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальным и сосудистым механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, аллогенной трансплантации, сепсиса, заболевания коронарной артерии, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеро-

склероза, болезни Альцгеймера, сепсиса, связанного с системным воспалительным ответом, септического шока, травмы спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистых нарушений, миокардита, цереброваскулярного нарушения, периферического сосудистого нарушения, реноваскулярного нарушения, нарушения брыжеечных/кишечных сосудов, васкулита, нефрита Шенлейна-Геноха, васкулита, связанного с системной красной волчанкой, васкулита, связанного с ревматоидным артритом, васкулита, связанного с иммунными комплексами, болезни Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, вращательной атерэктомии, перепончатой нефропатии, синдрома Гийена-Барре и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA).

48. Способ по п.47, где заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH).

49. Способ по п.47, где заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

50. Способ по п.43 или 44, где субъектом является человек.

51. Способ по любому из пп.43-50, дополнительно включающий введение субъекту антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента.

52. Способ по любому из пп.43-51, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозировке от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг.

53. Способ по п.52, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят в дозировке от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг.

54. Способ по п.52, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту один раз в неделю.

55. Способ по п.52, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в неделю.

56. Способ по п.52, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в месяц.

57. Способ по любому из пп.43-56, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту подкожно.

58. Способ по п.43 или 44, дополнительно включающий измерение гемоглобина и/или уровней LDH у указанного субъекта.

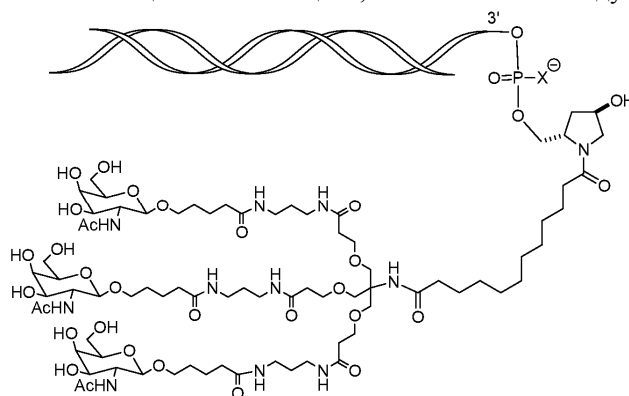
59. Средство, представляющее собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где dsRNA содержит смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность 5'-asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaa-3' (SEQ ID NO:2876) и антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность 5'-usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT-3' (SEQ ID NO:2889),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U; dT представляет собой дезокси-тимин нуклеотид и s представляет собой фосфотиоатную связь.

60. Средство, представляющее собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaa-3' (SEQ ID NO:2876) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT-3' (SEQ ID NO:2889),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U; dT представляет собой дезокси-тимин нуклеотид и s представляет собой фосфотиоатную связь;

лиганд конъюгируется на 3'-конце смысловой цепи, как показано на следующей схеме:



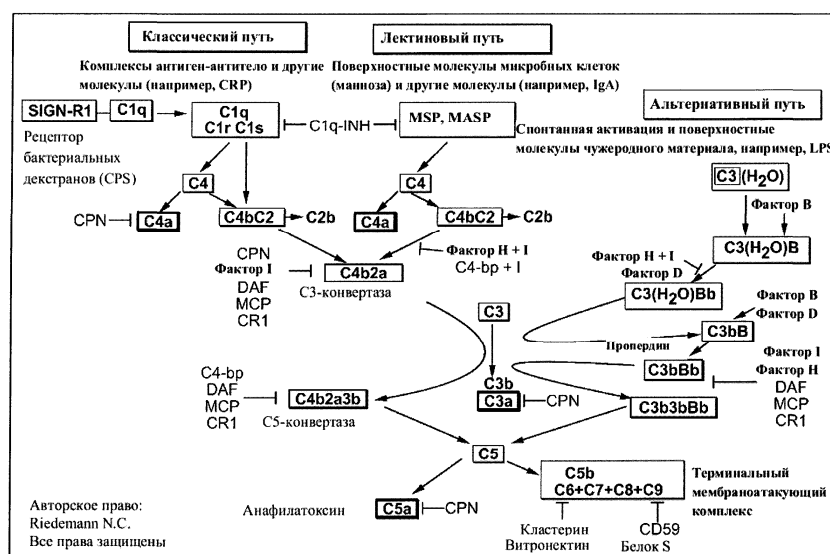
где X представляет собой O.

61. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента C5, содержащая средство, представляющее собой dsRNA, по п.60.

62. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, по п.60 или фармацевтической композиции по п.61 с лечением тем самым указанного субъекта.

63. Способ предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, причем способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, по п.60 или фармацевтической композиции по п.61 с предупреждением тем самым по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

64. Способ по п.62 или 63, в котором средство dsRNA или фармацевтическая композиция предназначены для подкожного введения.

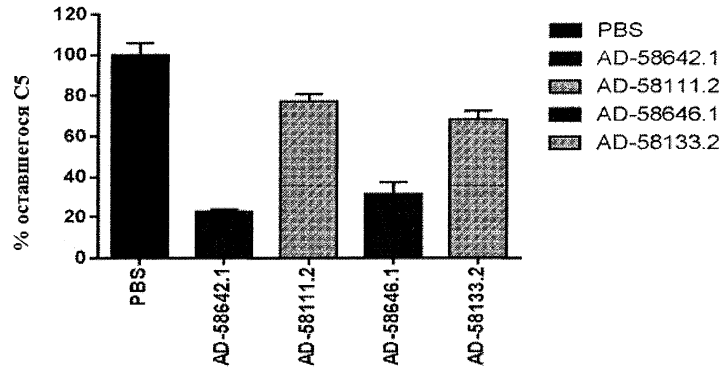


Фиг. 1

Уровни мРНК C5

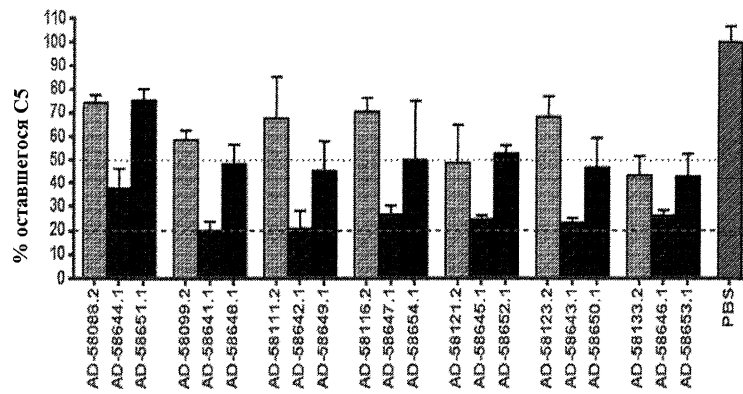


Фиг. 2



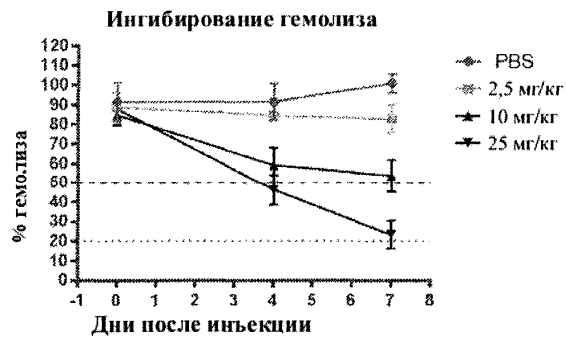
Фиг. 3

In vivo введение конъюгата на основе GalNAc для C5

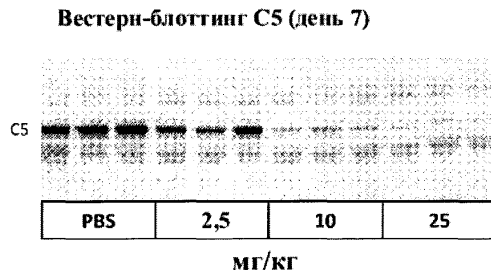


Фиг. 4

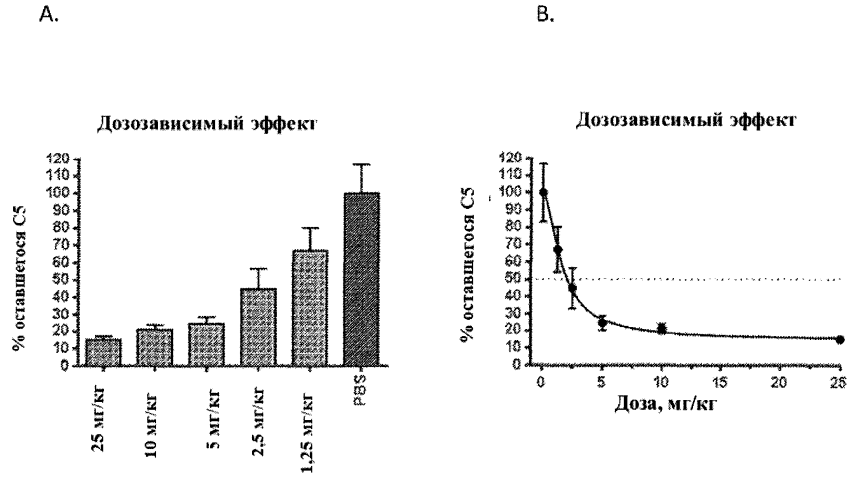
A.



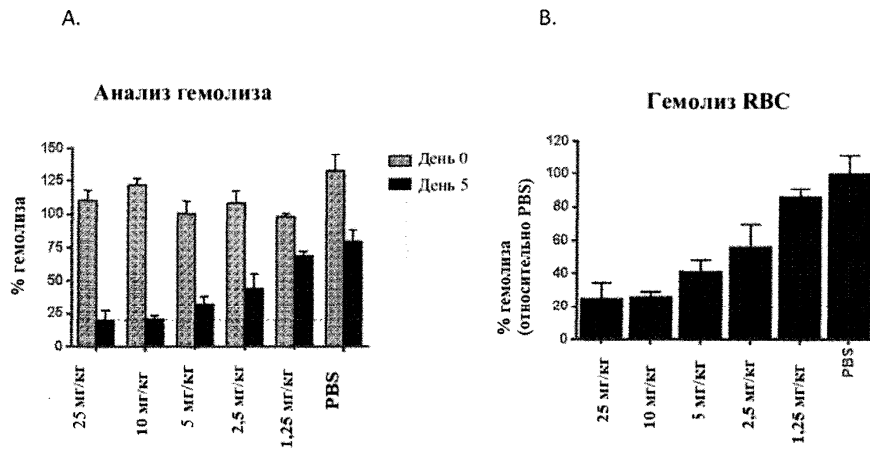
B.



Фиг. 5



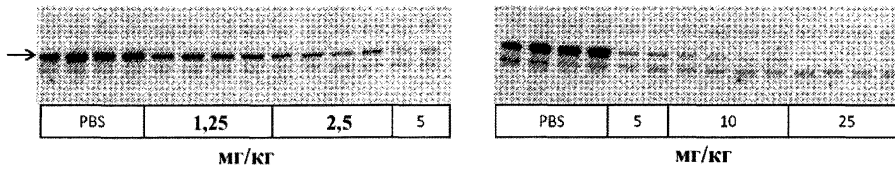
Фиг. 6



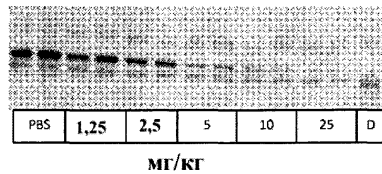
Фиг. 7

Сайленсинг гена белка C5 (4 мыши из каждой группы)

Образцы в день 5

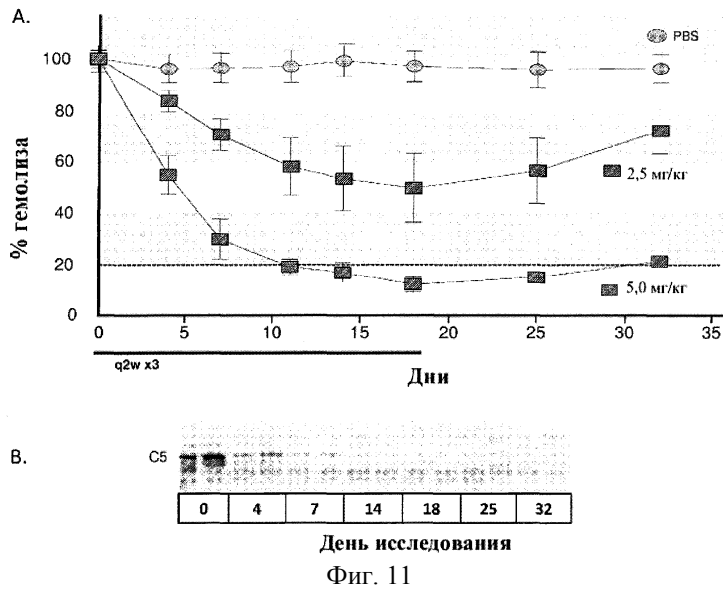
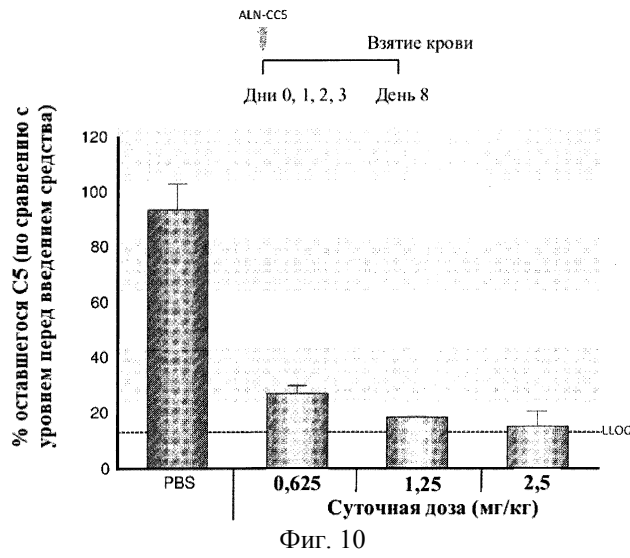
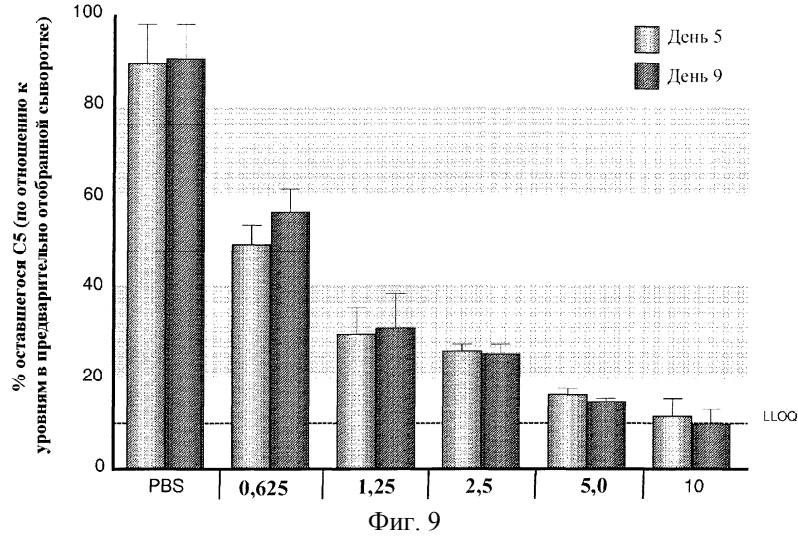


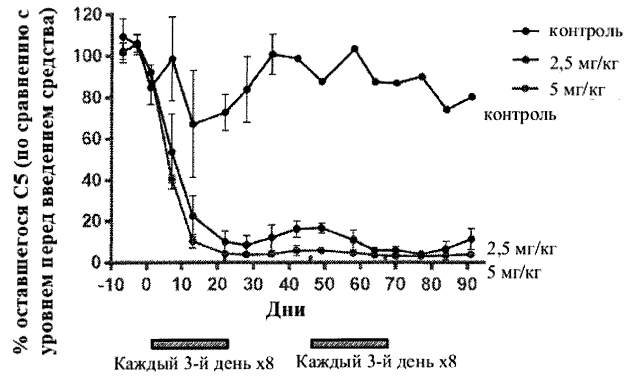
Сайленсинг гена белка C5 (2 мыши из каждой группы)



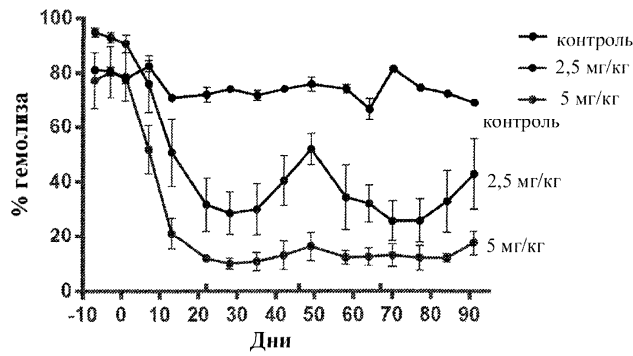
D – сыворотка крови, лишенная C5 (DVA/2)

Фиг. 8

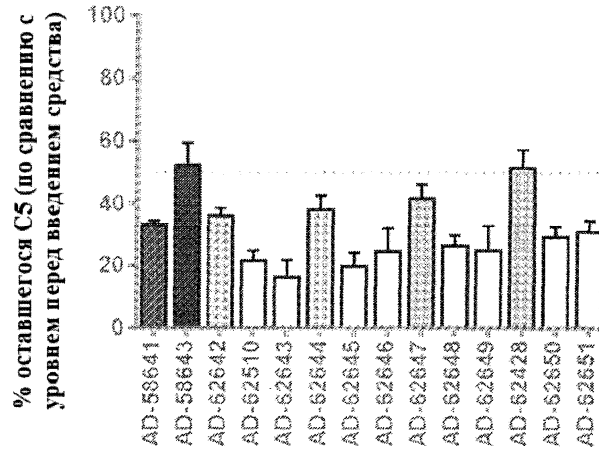




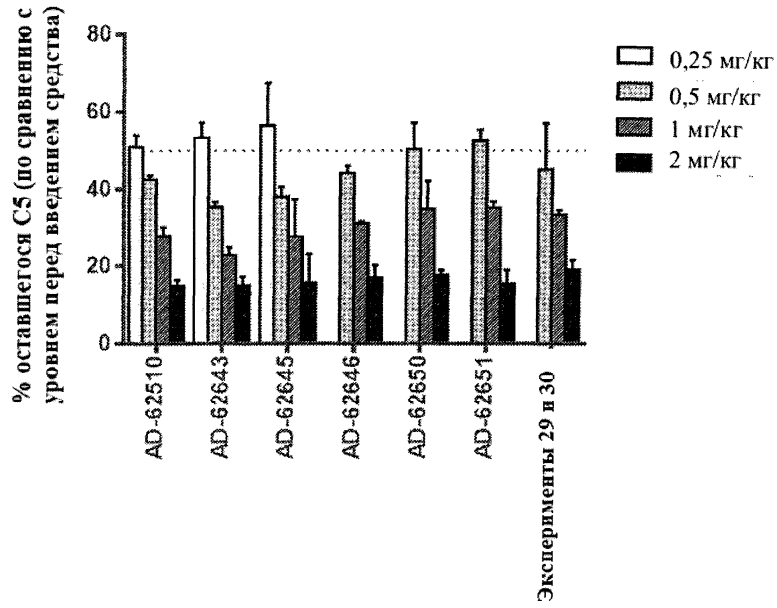
Фиг. 12



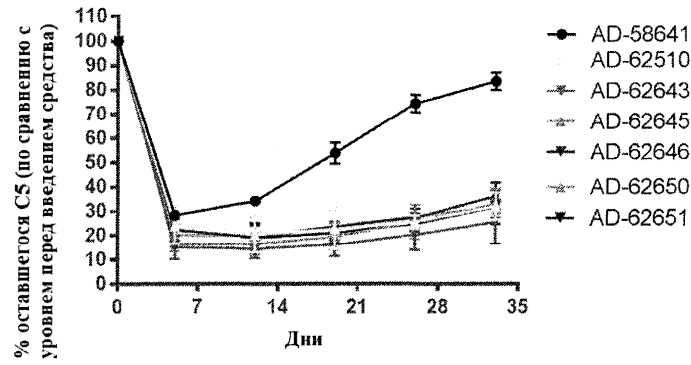
Фиг. 13



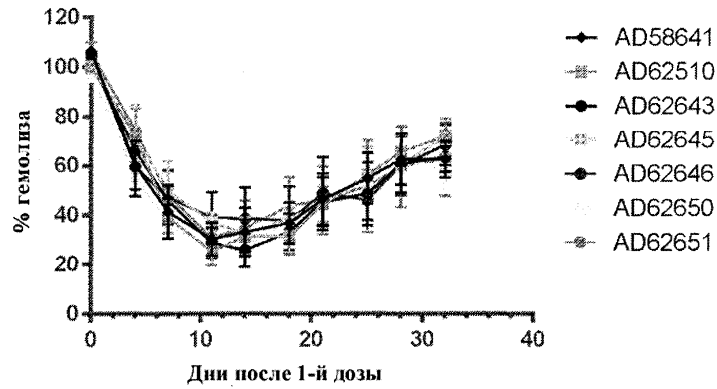
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

SEQ ID NO:1
>gi|38016946| эталонная последовательность |NM_001735.2| компонент 5 системы комплемента Homo sapiens (С5),
MRNATATATCCCGTGGTTCCCTGCTACCCTCCACCATGGGCGCTTTGGGAATACCTTGTCTTTTAAATCTTCTGGGGAAAACCTGGGGACAGGAGC
AAACATATGTCAATTTCCAGCACAAAAAATATCCCGTGTGGAGCATCTGAAAATATGTGATTCAAGTTTATGGATACACTGAAGCATTTGATGCA
ACAACTCTTATAAAAGTTATCTCTGATAAAAAATTTAGTACTCTCAGGCCATGTTCATTTATCTCTCAGAGAAATAAAATCCAAAACCTCTGCAAT
CTTAACAAATACAAACAAAAACAATTTCCCTGGAGGACAAAACCCAGTTTCTATGTGTATTTGGAAAGTTGATCAAAAGCATTTTCAAATCAAAAA
GAATGCCAAATAACCTATGACAAATGGATTTCTTCAATTCATACAGACAAACCTGTTTATCTCAGACCCAGTCAGTAAAAGTTAGAGTTTATTCG
TTGAATGACGACTTGAAGCCAGCCAAAAGAGAAACCTGCTTAACTTCATAGATCTTGAAGGATCAGAAATGACATGGTAGAAGAAATTTGATCA
ATTTGGAAATATCTCTTTCCCTGACTTCAAGATTCGGCTTAATCCCTAGATATGGTATGTGGAGCATCAAGGCTAAAATAAAGAGGACTTTTCA
CAACTGGAAACCGCATATTTGAAGTTAAAGAAATATGCTTGGCCATATTTCTGCTCAATCGAGCCAGAAATAAATTTCAATTTGGTTACAAGAAC
TTAAGAATTTTGAATTACTATAAAAGCAAGATATTTTATAATAAAGTAGTCACTGAGGCTGACGTTTATATCAATTTGGAATAAGAGAAGA
CTTAAAGATGATCAAAAAGAAATGATGCAAAACAGCAATGCAAAAACAATTTGATTAATGGAAATGCTCAAGTCACATTTGATTTGAAACAG
CAGTCAAAAGAACTGTACATACAGTTTGAAGATTTAAACAACAAGTACCTTTATATTTGCTGTAACAGTCATAGAGTCTACAGGTTGATTTCT
GAAGAGGCAAAAATACCTGGCATCAAAATATGCTCTCTCCCTCAAAAATGAAATTTGGTGTACTCTCTTTCTCTGAAGCCCTGGGATTCATA
TCCCATCAAGGTTGACAGTTAAAGATTCCTTGACCAAGTTGGTAGGAGGATCCCAAGTAACTGAAATGCACAAACAATTTGATTAACCAAGAGA
CATCTGACTTGAATCCAAAGAAAGTTAAACAGCTGTTGATGATGGAGTAGCTTCCCTTTGGCTTAACTCCCATCTGGAGTACAGGCTCTGGAG
TTAATGTCAAAAACCTGATCTCCAGATCTCCAGAAAGAAATCAGGCCAGGGAAGGTTACCGAGCAATAGCATACTCTCTCAGCCAAAGTTA
CCTTTATATGATGGACTGATACCAATAAGGCTTTCTAGTGGGAGAACATCTGAATATATTTGTTAGCCCAAAAAGCCCATATATGACAAAA
TAACCTCAATATAACTTGTATTTATCCAGGGCAAAATATCCACTTTGGCACAGGGAGAAATTTTCAGATGCATCTTAAAGATATAAAC
ATTTGGCAATACACAGAACATGGTTCCCTCATCCCGACTCTGGTCTATTTACATCTGTCACAGGAAACAGACAGCAGAAATTTGATGCTCAT
CTGGTTAAATATTTGAAGAAAAATTTGGCAACCAAGCTCCAGGTTTCACTGCTCTGATGAGATGCAATATTTCCAGGCCAAAGCTGTCTCTTA
ATATGGCAACTGGAAATGGATTTCTGGGTTGGCATTAGCAGCAGTGGACAGTGTGTGATGGAGTCCAAAGAGGACCCAAAAGCCCTTGGAAAGA
GATTTCAATCTTAGAGAAGTAGTCTGGGCTGTGGGGCAGGTTGGTGGCCCAACAATGCCAATGCTGTCCACTAGCTGGACTTACCTCTCT
CCTAATGCAAAATGCAGATGACTCCCAAGAAAATGATGAACCTTTGAAAGAAATTTCCAGGCCAAGAAGAACGCTGCAAAAAGAAATAGAAAGAA
TAGCTGTAAAATAAACAATTTAGTAGTAGAAGAAATGTTGTAGCATGGAGCTGGTTAAATATGATGAACCTGTGAGCAGGAGGCTGCACGG
ATTTAGTTAGGGCCAAAGTGAAGATTCCTTACCTGAAATGTTGTTGCTGCTCCAGCCAGCTCCGTTGCTAATATCTCTATAAAGAACTGCAAT
GGGAGGCTACACATGAGACCCCTGTACCAGTAAGCAAGCCAGAAATTCGGAGTTATTTCCAGAAAGCTGGTTGGGGAAATTCATCTGTTT
CCAGAGTAAACAACCTTGCAGTTTGCCTGATTTCTTAACCCACTGGGAAATTCAGGCGTTGGCATTCAAACACTGTGATATGTTTCT
GATACTGTCCAGGCAAAGTGTTCAAAAGATGCTTCCCTGAAAATGAATAACCATATCTGTTGTCCAGGAGAACAGATTCCAATGAAAGAAC
TGTTTACAACATATAGGACTTCTGGATGCACTGTTGTTAAAATGCTCTGCTGGAGGAAATCTGCACCTTCCGAAAAGCCAGTCAATGATCATC
AGGGCAACAAGCTCTCCAAATGTTGGCCAGAAAAGTAGAGGGCTCTCCAGTCACTTTGGTGACATTCAGTGTGCTCTCTGCTCTGCTGGAACT
CACACATCAATTTTCACTGGAGACTTGGTTTGGAAAAGAAATCTTAGTAAAACAATACAGAGTGGTCCAGAAAGGTTGCAAAAAGGAAAGCTA
TTCTGGTGTACTTTGGACTTGGAGGTTATTTAGGTAACATTAGCAGACGAAAGGAGTTCCCATACAGGATACCCCTTAGATTTGGTCCCAAAA
CAGAAATCAAAGGATTTTGAAGTAAAGGACTGCTTGTAGTGAAGTCTTGTCTGCACTTCAAGTCAAGGAGGATCAATATCTTACCCAC
CTCCCAAGGGAGTGCAGAGGGCGGAGCTGATGAGCTTGTCCAGTATCTATGTTTTTCACTACTTGGAAAACAGGAAATCATTTGAAACATTT
TCAATCTGACCCATTAATTTGAAGAGCAAACTGAAGAAAATTAAGAAGAGGATGTTGAGCATTTAGTCTCAGAAAATGCTGACTACTCTT
ACAGTGTGGAAAGGTGGAAGTCTAGCACTTGGTTAACAGCTTTTCTTTAAGAGTACTTGGACAAGTAAATAAATACGTAGAGCAGAACCAA
AATTCATTTGTAATCTTATTTGTTGGCTAGTTGAGAATATCAATAGATAATGGATTTTCAAGGAAAATTCACAGTATCAACCAATAAAAT
ACAGGTTACCTTGGCTGTGAAAGCCAGAGAAACAGCTTATATCTTACAGCCCTTACTGTGATTTGGAATTAGAAGGCTTTCCGATATATGCCCC
TGTGAAAATCCAGCACGCTCAATTAAGCTGACAACTTTCTGCTTAAAATACACTGCCAGCCAGAGCCTTTACATTTGGCCATTTCTGG
TATGCTCTTTCCCTGGAGATAAAAATCAACCCAGTTCCTTCAATGTTTCAGCTTTGAAGAGAGAAAGCTTTGGTTAAAGGTAATCCACCCAT
TTATCGTTTTGGAAAAGCAATCTTCAGCATAAAGACAGCTCTGTACTTAACTGGTACCGCAGTATGGTAGAACAACCTGCTTATGCTTTAC
TCACCAGTCTGAATTTGAAGATATAAATTTAGTTAACCCAGTCTCAAAATGGCTATCAGAAAGCAGAGGATGAGAGGTTGGCTTTTATTCAC
CAGGACACAATCAATGCCATTTAGGGCCCTGACGGAATATTTCACTCTGGTTAAAACAACCTCCGCTTGGATATGGACATCGATTTTCTTACAAGCA
TAAAGGTGCTTACATAAATATAAATGACAGACAAAGAAATTTCCCTGGGAGGCCAGTAGAGGTTCTCTCAATGATGACCTCATTGTCTAGTACAG
GATTTGGCAGTTGGCTGGCTACAGTACATGTAACAACCTGTAGTTTCAAAAACCACTACCTCTGAGGAAGTTTGCAGCTTTTATTTGAAAATCGAT
ACTCAGGATATTTGAAGCATCCCTACAGAGGCTACGGAACCTCTGATTAACAACCGATAGTAGCATGTGCCAGTACAGAACCCAGGAGGAGAA
ATCATCTCTGGACTCTCTCATGCGGTGATGGACATCTCTTTCCTACTGGAATCAGTGCAAAATGAAGAAGACTTAAAAGCCCTTTGGTGGAGGGG
TGGATCAACTATTTCACTGATTAACAAATCAAAAGATGGACATGTTATTTGCAACTGAAATTCGATTTCCCTCCAGTATTTCTTTGTAGCATT
CGATATTTGAACTTTTGAAGTTGGGTTTTCTCAGCTCTGCCACTTTCAAGTGTACGAAATACCAAGACCAGATAAACAAGTGTACCATGTTTTA
TAGCACTTTCAATATAAATTCAGAAAGTCTGTGAAGAGCCCGCTGCAAGTGTGTAGAGCTGATTTGGGCAAATGCAGGAAGATTTGGATC
TGCAACTCTCAGAGACAAGAAAACAAACAGCATGTAACCAGAGATTGCATATGCTTATAAAGTTAGCATCACATCCATCAGTGTAGAAAAT
GTTTTTGTCAAGTACAGGCAACCCCTTCTGGATATCTCAAAAACCTGGGAAAGCTGTGCTGAGAAAAGACTCTGAGATTACCTTCAATTAAGAAGGT
AACCTGTACTAACCTGAGCTGGTAAAAGGAAGACAGTACTTAAATATTTGGTAAAAGAACCCCTCCAGATAAATAACAAATTTCAATTTCAAGTACA
TCTACCCCTTAGATTCCCTGACCTGGAATGAATACTGGCTTAGAGACACAACTGTTCATCTGTCAAGCAATTTTAGCTAATTTAGATGAATTT
GCCGAGATATCTTTTAAATGGATGCTAAAATTCCTGAAGTCAAGTGCATACAGTTTGCCTTATGGACTCTTGTGTTGTTGAAAGTTCGTTTTT
TGTTTTCTCTTTTTTAAACATTCATAGCTGGCTTATTTGTAAGCTCACCTTACTTAGAATTAGTGGCCTTGCCTTATTAGAGAAATGAT
TCAAAATGCTTAACTTTCTGAAATACATGGCTTTGGAGGCCATGAAGACAGATCTCTTCCAAAGTTATTTGGACCCGAAACAATAAATTTGA
ACACTCTCCAAAACCTACCACTCAGGAATGTTTTCTGGGGCCGAAAGAACAGTCTCAATTTGAAAGGAGTATTCAAAAACATGGCCTTTGCTTGA
AGAAAATACCAAGGACAGGAACTGATCAATTAAGCCAGTTCCTTTCAAAAAAATAAAAAAAAAA

Фиг. 18А

SEQ ID NO:2
>gi | 297270262 | эталонная последовательность | XM_001095750.2 | ПРЕДСКАЗАННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: компонент 5
системы компонента *Musca mulatta* (C5), мРНК
CA TGA TTTCC TGT ACC TCA ACCA TGG GCT TTTGGGAAIAC TTTG TTTTAAI CTTCC TGGGAAAAC TGGGGACAGGAGCAAACA IAGI CAI T
TCAGCACC AAAAATATTCCTGTGGAGCATCTGAAAACATTGTGATTCAAGTTATGGATACACTGAAGCATTTGATGCAACAATCTCTATAAAAAG
TTATCTGTATAAAAATTTAGTTACTCTCAGGCCATGTTCA TTTATCTCTCAGAGAAATAATCCAAAACCTGGCAGTCTTAACAATACAAACCAAACA
ATACCTGGAGGACAAAACCAAGTTCTTATGTGATTGGAAGTTGATCAAAGCATTTTCAAATCAAAAATAATCCAATAACCTATGACAATG
GATTTCTCTTCACTCATACAGCAAACTGTTTATCTCCAGACCAATCACTAAAGTTAGAGTTTATTCGTTGAATGATGACTTGAAGCCAGCCAAA
GAGAAAAGTCTTAAC TTTTATAGATCTGAAAGGATCAGAAATGACATGGTGAAGAAATGATCATATTTGGAATTTATCTTTTCTGACTTCAAG
ATTCGCTATACTAGATATGATGATGGATGATCCAGGCTAAATATAAAGAGGACTTTTCAACAACCTGGAACCTGATTTTTGAAAGTTAAAGAAATA
TGTCTTGGCACATTTTCTGTCTCAGTAGAACCAGAAAGTAATTTCA TTTGTTATAAGAACTTTAAGAAATTTGAAATTAATAAAGCAAGATATTT
TTATAATAAAGTAGTCACTGAGGCTGATGTTTATATCACTTTGGAATAAGAGAAAGACTTAAAGATGATCAAAAAGAAATGATGCAACAGCAAGT
CAAAAACAATTTGATAAATGGAATGCTCAAGTCACTTTGATTTCTGAAACAGCAGTCAAAAGAACTGATACACTACAGTTTGAAGATTTAAACA
CAAGTACCTTTATGCTGTAAAGTCAAGTCTACAGTGGATTTCTGAAAGAGCCAGAAATACCTGGCATCAAAATATGCTCTCTCCCTACA
AACTGAAATTTGGTGTCTACTCTCTTTCTGAAAGGCTGGGATTCATATCCATCAAGGTGCAGGTTAAAGATGCGCTTGACCAAGTGGTAGAGGG
GTCCAGTAACACTGAATGCACAAAATGATGTAACCAAGAGACATCTGACTGGAGCCAAAGGAAAGTGAACACGTTGATGATGGAGTA
GCTTCTGTTGGTTAATCTCCATCTGGAGTGACGGTGTGGAGTTAATGTCAAACCTGATGCTCCAGATCTCCAGACGAAAATCAGGCCAGGG
AAGGTTACCGAGCAATAGCATCTCATCTCAAGCAAGTTACCTTTATATCGATTGGACTGATAACCAAGGCTTCTGCTAGGGAGAAATTTG
AATATTTTGTACCCCAAAGCCCATATATGCAAAAATAACTCACTATAATTAATTTTATCCAAAGGCAAAATATCCACTTTGGCACAAGG
GAGAAACCTTCAGATGATCTTATCAAAGTATAAACTTCCAGTAACGCAAGACATGTTCTTCACTCCGACTCTGGTCTTATACATCGTCAAGG
AGAGCAGACAGCAAGATTAGTGTCTGATTCAGTCTGTAAATATTAAGAAAATATGGGCAACAGCTCAGGTTCACTGTCTCTGATGATGATG
ACATATTTCTCCAGGCCAAACTGTCTCTTAAATAGTAACTGGATGGATTTCTGGTGGCTTAAACAGCATGGACAGCTGATGATGGAAGTCC
AAAGAAAGCCAAAAGCCCTGGAAAGAGTATTTCAATCTTAGAGAAAGTATCTGGCTGTGGGGCAGGTGTGGCTTCAACAATGCAATG
TGTTCCACTAGCTGGACTACCTTCTCACTAAATGCAATGCAAGTACTCCAAAGAAATGATGAACCTTTGAAAAGAAATATCAGGCCAAGAA
ATGCTACAAGAGAAAGATAGAAAGAAATAGCTCTAAATATAAACATTTAGTAGAGAAAGAAATTTGTTACGATGGAGTCCGATTAATCATGATGAA
ACCTGTGAGCAGCAGCTGCACGATTTAGTGTAGGCGCAGATGCTCAAAGCTTCACTGAATGTTGTGCTGCAAGCCAGCTCCGCTCAATA
AATCTCATAAAGACTTGCAATTTGGGAAGGCTACACATGAAAGCCCTGTACCAGTAAAGCAAGCAAGAAATCGGAGTTATTTCCAGAAAGCTGTT
ATGGGAAAGTTCATCTTTCCAGAAAGAAACAGTTGCAAGTTGCCCCACTGATTTCTGAACTACCTGGGAAATTCAGAGTGTGGCATTTCAACA
GTGGTATGTGTTGCTGATACTTAAAGGCAAGGTTCAAAGATGCTCTGGGAAATGAATACCATATTTCTGTACAGGAGCAAGCTGATG
CCAGTTGAAAGAACTGTTTACAACATAGGACTTCTGGATGCAAGTCTGTGTTAAATGCTGCTGTGGAGGAAATGCACTTCAGAAAGCCCA
GTACTGATCATCAGGGCACAAGTCTCCAAATGTGTGCGCAGAAAGTAGAGGGCTCCTTAATCACTTGGTACCTTACTGTCTCTCTCTGGA
AATTTGCCCTTCAGAACATCAATTTCTCACTGGAGACTTCTGTTGGAAAAGAAATCTTAGTAAATCGTTACGAGTGGTCCAGAGAGGTTCAAAAAG
GAAAGCTATCTGGTACTTTGGATCTAGGGGTTATTTGNN
TTGGTCCCAAAACAGAAATCAAAGGATTTGAGTGTAAAAGGACTGCTTGTAGGTGAGATCTTGTGCTGAGTCTTAAAGTGGGAGGATCAAT
ATCTCAACCCACTCCCAAAAGGAGTGCAGAGGGGAGCTGATGAGCGTTGCCAGTATTCATGTTTTCACTACCTGGAACAGGAAATCAIT
GSAACATTTTCAATCCGACCCATTAATTAAGAAAGCGAACCTGGAGAAAATAAAGAAAGGAGTGTGAGCATTATGCTTCAAGAAATGCTG
ACTATCTTACAGCGTGTGGAAGGTTGGCAGTCTGACACTGGTTAACAGCTTTGCTTAAAGACTTGGACAATACATAAATATGATAGACA
GAACCAAAATCAATATGTAATTTTATTTGGCTGTTGAGAAATTCAGTTAGATAATGGATCTTCAAGGAAATTCACAGTATCAACCAATAA
AATTACAGAAATCAACACAGCTCAATTAAGCTGACACCTTCTGCTTGAATACTGCCAGCCAGAGCACCTTACATTTGCCATTTCTGCT
ATGCTTTTCCCTGGGAGATAAAACCTCACCCAGTTTTGTCAATTTGTTCACTTTGAAAGAGAGAAAGCTTTGGTTAAAGGTAATCCACCCATTTATC
GTTTTTGGAAAGACAGTCTTCAACATAAAGACAGCTCTGACTCAACTGACTGACAGCAGTATGGTAGAAAACACTGCTATGCTTTTACTCACCAGT
CTGAACCTGAAAGACATAAATATGTTAAACCAATCATCAATGCTATCAGAAAGAGCAGAGTATGGAGTGGCTTTTATTAACCCAGGACCAAA
TCAATGCCATCGAGGGCTGCAGAAATTTCACTCTGGTTAAACAGCTCCGCTTGAATATGGACATCGATGTTGCTTACAAGCATAAAGGTCCTT
CATAAATATAAATGACAGACAGAAATTTCTTGGAGGCCAGTAGAGGTTCTTCAATGATGACTCGTTGTCAGTACAGGATTTGGCAGTGGCT
TGGCTACGGTACATGTAACAACCTGATGTTCAAAAACAGTACTCTGAGGAAAGTTGCGCTTTTATTTGAAAATGATACTCAGSATATGSAAGCA
TCCCCTACAGAGGCTACGGAACCTGATTAACAACGCATAGTAGCATGTGCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAAAGATCATCTTCTGATCTCTC
ATGCAAGTATGATGACATCTCTCTGCTA CTGG AATCAATGCAAAATGAAGAAAGACTTAAAAGCTCTTGTGGAAGGGGTTGATCAGCTATTCACCTGATTA
CCAAATAAAGATGGAATGTTATTTCTGCAACTGAATTCGATCCCTCCAGTGAATTTCTTTGTGTACGATTCGCGATTTTTGAACTTTTGAAGTTGG
GTTTCTTGTCTGCTCACTTTACAGTGTATGAAATACCACAGACAGATAAACAGTGTACCATGTTTTATGACTTCCAATATAAATTCAGAAAGT
CTGTGAAGGAGCCACGTGCAAGTGTATGAAAGCTGATTTGGGCAATGCAGAAAGAAATGGATCTGACAATCTCTGCAGAGACTAGAAAACAAC
AGCATGTAAACCCAGATGATGATGTTATAAGGTTATCATCACTCATCACTACTACAGAAATGTTTTGTCAAGTACAAGCAACCTCTCTGGATAT
CTACAACCTGGGAGCTGTGGTGAAGAAAGCTGAAATCACCTTCAITAAAAGTAACTGCACTAACGCTGAGCTGGTGAAGGAAAGACA
GTACTAATTAATGGGAAAGAAAGCTCCAGATAAAAATCAATTTCACTTTCAAGGTACATCTACCTTTAGATTCCTGACTGGATGAAATCTGGCC
TAGAGACACAACATGTTCTGCTGCTCAAGCATTTTATGCTAATTTAGATGAAATTTGCTGAAGACATCTTTTAAATGGATGCTAAAATCTCTGAAAGT
AGCTGATACAGATTTGCACTTATGGACTCTGTTGTTGAAAGTTGTTTTTTCTCGTTTTTTGCTTTAAACATTCACAGCTGGTCTATTTGTAAG
CTCACTTACTTAGAATAGTGGCACTGCTTTATAGAGAATGTTTTAAACGCTGTAACCTTCTGAAATAACATGGCCTGGAGGGCATGAAGAC
AGATACCTCCAAAGTTATGGACACCGGAAACAATAAATAGAACACCTCTCAAACTACCACTTAGGAATGTTGCTGGAGCCGAAAGAACAG
TCCATGAAATGGAGTATCAAAAACATGGCTTCTGTTGAAAGAAAATACCAGGGACAGGAACTGATCATTAAGCTGAGTTGCTTCAA
CTGTCTAAAAA

Фиг. 18B

SEQ ID NO:4 >п | 392346248 | эталонная последовательность | XM_345342.4 | ПРЕДСКАЗАННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ:
компонент 5 системы комплемента Rattus norvegicus (C5).
МРНК: ATGGATAGCACAGAGACCGACAGATGTCTACAGCCCGCCATCATCTTTCCGGAAACATAAATCACTGCTTGTGCCCTTGTAGGTGGGTTT
TCGGAAGAGGCAGAAAATTCCTGGCATCAAAATACGTCCTCTCCCTATACACTGAATTTGGTCGCTACCCCTCTTTCTGAAAGCTGGGATTCATTT
TCCATCAAGGTACAGGTTAAGGATTCACTCGAGCAGTTGGTAGGAGGGGTCCAGTAACCTGTGACGACAAACAGTCAATGTGAATCAAGAGACA
TCTGACTTGGAAACCAAGAGGAGCATCACACACTGCTGATGAGTGGCTTCATTTGTGGTGAACCTCCATCAGAAGTGACATCACTGAAGTTTG
AGTCAAAAATGATGCCCGGAACCTCCGGAAGAAAATCAAGCCAGCAAGAAATATGAAGCAGTTACATCACTCCCTCAGCCAGAGTTACATTTA
CATTTGGCTGGACTGAAAATCAAGCCATGCTTGTGGGAGAAATATCGAATATATCGTACCCCAAGAGTCCATATATTGACAAAATAACTCACT
ATAAATTCTTGATTTTATCCAAAGGCAAAATGTACAGTATGGCACAAGGAGAAACTTCTCTATTCTTATCAAAAATATAAACATCCCAAGTGCAC
AGGACATGGTTCCTCAGCGCGCTCTGGTCTATTACATAAGTCAAGGGGAGCAGACAGCAGAAATGGTGGCTGACGCAGCTGGATAAACATTTG
AGGAGAAGTGTGGCAACAGCTCCAGGTCCATGTCTCCAGATAAAGACGTGTATTCTCCAGGCCAAACTGTGCCCTGACATGGTGAAGTGAAGC
AGACTCATGGGTGGCACTATCTGGGTGGACAGCGCTGTGTATGGAGTCCGGGAAAGGCCAAAAGGGCCATGCAAAAGAGTGTCCAAAGCTTTTGA
TGACAAGAGTGAACCTGGCTGTGGGGCAGGTGGTGGCCGTGACAATGTASATGTATTCATCTAGCTGGGCTCACCTTCCACCAATGCAAAACGCA
GATGACTCCCAATACCAGTACTCTTGAAGAAAATCTCAGGCCAAAGAGACCTGCAGCTCTGCATCAGAAAGTGAAGAAACAAAGCTGT
AAATACAAACCCGTGTGCCCAAGAAATGCTGTTATGATGGAGCCGAGAAAACAAATACGAAAACCTGTGAGCAGCGAGTTGCCCGGGTGCACATA
GGCCCAACACTGCATCAGGGCTTCAACGAGTGTGTACTATTGCGGATAAGATCCGAAAAGAAAGCCACCAAAAGGCATGCTGTGGGAAAGGATC
CAAAATAAGGCCCTGTACCAGTGTAGGAGCAGAAATCCGAAGCTACTTCCAGAGAGCTGGCTATGGGAAAGTTCATCGTGTCCCAAAAAGAAACC
AGCTGCAAGGTTGCACTGCTGACTCACTGACGACCTGGGAAATCAAGGCATCGGCATCTCAGACAATGGTATATGTGTTGCTGACACACTCAAGGC
AAAGGTGTTCAAGATGCTTCTGAGATGAACATACCATTTCTGTTGACGAGGGAGCAGATCAAATGAAGGGAAACCCTTACAAATATATAGG
ACCTCTGGGACAATGTTCTGTGTTAAAATGTCTGCGGTGGAGGAAATCTGCACTCCAGGAAAGCTGCTGACCCCTCAGACCTCAGACTCAGCTCCAG
ATGTGTGCGCAGAGAATAGAGGGCTCCTCAGTCACTGGTGACCTCAGCCTGCTCTCTGGAATTTGCCCTTCACTCCATAAACTTCTCACTAGA
GACTCATTTGGGAAAATACTTAGTGAAGACATTACGGGTAGTCCGAGAAGGATCAAAAAGGGAAAGCTATGCTGGTGTGACTGGACCCAG
GGGAGTTTATGGTATTGTTAACAGACGAAAGGAATCCCATACAGGATACCATAGATTTGGTCCCAAAACCAAGTCAAAAAGGATTTTGGTGTGA
AAAGGACTGCTTATAGGGGAATCTTGTCCACGGTTCTGAGTAAAGAAAGGCATCGACATCCTAACCCACCTCCCAAGGGCAGCGCCGAGGAGAA
CTCATGAGCATAGTCCCGTGTCTACGTTTCCACTACCTGGAAGCAGGAAACCATTTGGAATATTTCCACCCTGATACGTTAGCTAGAAAAACAGAG
CCTGACAGAAAAATAAAGAGAGGGCTGGTGAAGCTCATGCTCCACAGAAACGCTGACTATTCTCAGCATGTGGAAGGGAGCAAGCTCATGTGC
CTGGCTGACAGCTTTGCTCTGAGAGTCTTGGACAGGTGAACAAGTATGTGAACAAGACCAATACTCGATCTGTAACCTGTTATGCTGATTTG
AGAAATGTGAGTGAAGACGATCTTCAAGGAAAATCCCAATATCTACCAATAAAATACAGGGTACTTTGCTGCTGAAGCCCAAGAGAACAC
TTTATATCTTACAGCCTTTCTGTGATTTGAAATAGAAAAGGCTATTGGCATAATGCCCAAGGAGAAAATCTACACAGCGCTGGTAAAGCTGACTCCT
TCCTACTTGAAGGACCTGCTTCCAAGAGCACCTTCCACCTGGCCATTGTGGCCTATGCTCTCTCCCTGGGAGACAGAAACCCACCCGAAAGTTTCGTT
CTATTGTGTCAGCCCTGAAGAGGGAAGCTTTGGTAAAGGAGACCCGCCATTTACCGTTTCTGGAGAGACACTCTCCAAGCTCCAGACAGCTCAGC
ACCCAAACAGCGGCACAGCAGTATGGTAGAAAACCCAGGCTATGCTTTGCTCACCAGCTGAACCTGAAGGAGACGAGTTATGTCAACCCGATCATC
AAGTGGCTATCTGAGGAGCAGAGGATGGAGGCGGCTTTTATCCACCCAGGATACCATTAACGCCATCGAGGGCCTGACAGAGATTTCACTCTCGG
TTAAACAACCTCATTGGATAGGATCAATGTCTCTCAAAAACAAAGGGGATTTCTACCAATATAAAGTGAACAGAGAAAGAACTCTCCGGAG
GCCAGTGGAGTACCCCTCAATGATGACTCATCGTCAACACAGGCTATAGCAGTGGCTTGGCTACAGTATATGTA AAAACTGTGTTTCAAAAAC
AGTGTGCTGAGGAAATTTGCAGCTTTACTTGAATAATGATACCCAAGAAAGTTGAAGCTCCAGTACCTCAGCTACAGTGAAGTGGGACACAAAGC
GCATAATAGCCTGTCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAGGAGTCAAGCATCTGGGTCTCCCATGCAATATGGATATACTGCTGCCAGCCGGAATCG
GAGCAACCAAGAAATTTACGAGCTTGTGGAAAGGAGTATGATCAACTCTAACTGATTTACCAGATCAAAAGACAGTCAATGTTATCTGCAATGAA
TTGATTTCCCTCCAGAGATTTCTTTGTTGTTCCGGTATTTGAACTTTTCAAGTTGGGTTTCTGAACTGCTACGTTCAAGGTGACGATACGAGTAT
CACAGACAGATAAGCAGTGTACCATGATTTACAGCACTCTGACACCAACCTTCAGAGAGTCTGTGAAGGAGGGGCTGCAAAATGCGTTGAAGCTG
ATTTGGGCAACTGCAAGCAGAACTGGACCTGGCCATCTCTGACAGACACCAAGGAAAGAAACAGCATGTAAACCAGAGATTGCATATGCTTATAAGG
TCAGGATCAGCTGCGCCAGGAAAGAAAACATTTTGTCAAGTACACTGCGAGCTCTGGATATTTACAAAACAGGGGAAAGCCGCTGTGAGAAGG
ACTCTGAGATCACCCTCAATAAAGATAAGCTGTACCAACGCCAAGCTGTGAAAGGAAAGCAATTTAATCATGGGCAAGAGGCTGTGCAGAT
CAAAACAATTTCAAGTTCAAGTATATATACCCTAGATTTCTCCACCTGGATTGAATTTGGCCACAGACACAACGTTGCTCATCTGCCAAAGCGTT
TGTAGCTAATTTGAGCAGTTCGCTGAAGACATCTTTCTAAATGGCTGTGAAAATGCTCAGGAAAGTTCTGCTGCGTGGCTTCCCGGTACTCTGT
TGGTGGCTCCTAGGAGCCAGGATCGCTTGGAAAATAGCCTAGAATCGGATACATTTCTTATAGTAAAGCGTAAAGTTGAAGAGTTACTTTGTGAA
ACAAAATAGCTTGTGGAGAGCCGAAGGCAAGGCTCCCAAGGCTATTGGACATCAGCACCAATAAGCTGGAAACAAGTCTGTAACGTTAGCAGCCAG
GGGTGTTGTTGGGGCCGSAAGAAAGACTCACTGAAATGTAGCCCTTAGGAAAACATGGTCTGCTGAAAAAAAATAACCAAGGACAGAAA
ATGCCATAAAGCTGACTTTGCACTCAACTGTA

Фиг. 18D

SEQ ID NO:5 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:1

TTTTTTTTTTTTTGGAAAGCAARLTCAGGCTTAAATGATCAAGTTCCTGTCCTGGTATTTCTTCAAGLAAAGGCLATGTTTTGTAATCTCCC
TTTCAATGGACTGTTCTTTGGGCCCCAGCAAAACATTCCTGAGTGGTAGGTTTGAGGAGGTTCCAATTTATTGTTTCGGGTGCCAATAACCTTGGAG
GAGTATCTGCTTCATGCCCTCAAGGCCATGTTATTTGAGAAAGTTACAGCATTGAAATCATTCTCAATAAAAGCAAGTGCACCTAATCTAAGTA
AAGTGAAGCTTCAAAATAAGACCAGCTATGAATGTTTAAAAAAGAAAGAAAACAATAAAAGCAACTTCAACAACAGGGATCTCAATAGTGCAAACTG
TATGCAGCTGAACCTCAGGAATTTAGCATCCATTTAAAAAGATATCTTGGSCAAATTCATCTAAATAGCTAAAAATGCTTGACAGCATGAACATGT
TGTGTCCTAGGCCAGTATCAATCCAGGTCAGGGAATCAAAAGGGTAGATGTACCTGAAACTGAAATGTATTATCTGGAGGGCTTCTTACCCA
TAATTAAGTACTGCTCTTACCAGCTCAGCGTTAGTACAGGTTACCTTTTAATGAAGGTAATCTCAGAGTCTTCTCAGCAACAGCTTCCCAGT
TTTGTAGATATCCAGAAGGGTTGCTTGTACTTGACAAAACATTTTCTACAGTGTGGATGTGTGCTAACTTTAAGCATATGCAACTCTGGTT
ACATGCTGTTTGTCTTGTCTGACAGAGATTGACAGTCCAAATCTTCTGCAATTTGCCACAATCAGCTTCTACACACTTGCACGCGGCTCCTTCA
CAGACTTCTGAAATTTGATATGGAAAGTCTATAAAACATGGTACACTGTTTATCTGGTCTGTGTATCTGACACTGTGAAAGTGGCAGGACTGAG
AAACCAACTCAAAAGGTTCAAAATATCCGCAATCTGACACAAGGAATCTGAGGGAATCGAATTCAGTTCAGAAATAAACATGCTCCATCTTGT
ATTTGGTAATCAGTGAATGTGATCCACCCCTCCACAAGGGCTTTAAGTCTTCTCATTGCACTGATCCAGTAGGCAAGGAGATGCTCATCACC
GCATGAGAGGATCCAGATGATGATTTCCCTGCTGGGCTGTAGCTGGCACATGCTACTATGCGTTTGTATCAGAGTTTCCGTAGCCTCTGTAGT
GGATGCTTCAATCTCGAGTATCGATTTTCAAATAAAAGCTGCAAACTTCTCAGAGGTAATGTTTGTGAACTCAGGTTGTTACATGACTGTAAGC
CAAGCCACTGCCAAATCTCTGACTGACAATGAGGTCATCATTGAGAAGCACCTCTACTGGCTCCCAAGGAAATCTTGTCTGCTTTATAATATG
TAAGGCACCTTATGCTTGAAGAACATCGATGCTACTCAAGGGAGTTGTTAACCAGGAGTGAATTTCCGTAGGCTTCAATGGCCTCAATGGCATTGA
TTGTGCTGGGTTGAATAAAAGCCACTCCATACCTCTCTCTGTAGACCATTTGATGACTGGGTAACATAATTTATCTTCAAGTTCAGACT
GGTGTGTAAGCAAGGCAAGGCTTGAATATCCGCAATCTGACACAAGGAATCTGAGGGAATCGAATTCAGTTCAGAAATAAACATGCTCCATCTTGT
AATGGGTGGATACCTTAAACCAAGCTTCTCTTCAAAGCTGAAACAAATGAAAGCAACTGTTGGGTGAGTTTATCTCCAGGGAAAGAGCAT
CGCAGAAATGCCAAATGTAAGGTGCTCTGGGCTGCAAGTGTATTTCAAGCAGAAAGTTGTCAGCTTAAATAGAGCTGTGCGATTTTCCACAGG
GGCATAATCGAAAGCCCTTCTAATTCAAATCACAGTAAGGCTGTAAGATATAAGTGTCTCTGGGCTTCAACAGGCAAGTCAATGGCATT
TATGGTGTACTGTGAATTTCTTGAAGAGTCCATTTATCTAATGATAATTTCTCAACTAGCCACAATAAGAAATTCACAAATGAAATTTGGTCTG
CTACGTTATTTTACTTGTCCAAAGTACTTAAAGCAAAAGCTGTTAAACCAAGTGTACACACTTCCACCTTCCACACACTGTAAGAGTGTACAGCA
TTCTGTAGGACATAATGCTCAACATCCCTTCTTAATTTTCTTCAAGTCTCTGCTTCAATTAATGGGTCAGAAATGAAATGTTTCCATGATTTCC
TGTTTCCAGTAGTGAACACATAGAATACTGGGCAACGCTCATCAGCTCCGCTCTGCACTCCCTTGGGGAGGTGGGTTAGGATATGATGCT
TCTGACTTGAACCTGCAGACAAGATCTACCTCAAGCAGTCTTTTCACTCAAAATCTTTGATTTCTGTTTTGGGGCAAAATCTAAGGTTATC
CTGTATGGGAACCTTCTGCTGCTAATGTTGATACCAATAACCTTAGGATCCAAATGAACTTCAACAGCAAGATAGCTTTCCCTTTGACACCTTGGCACC
ACTCGTAATGTTTTTACTAAGATTTCTTTCCAAACCAAGTCTCCAGTGAATAATGATGTTGTGAAGGCAATTTCCAGAGGAAAGCAGCATGAATGT
CACCAGTGACTGGAGGAGCCCTCTACTTCTGGCGCACACATTTGGAGACTTTGTGCCCTGATGATCAATGACTGGGCTTCCGAAAGTGCAGATT
CTCCACAGCAGACATTTAACAACAGAACTGCATCCCAAGTCTTATAGTTGTAACAGTTCCTTTCAATGGATCTGTTCTCTGCTACACAGAAAT
ATGGTATATTCATTTCCAGGAAGACATCTTGAACACCTTTGCTTGAACATGACAGTATCAAGCAACATATACCAAGTGTGAAATGCCAAGCCCTGAAAT
CCAGGTGGTTAGSAAATCAGTAGGGCAACTGCAACTGTTTCTCTGGAACAAAGTGAACCTTCCACAACAGCTTCTGGAATAAATCTCG
AATTTCTGGCTTGTACTGGTAACAGGCTTCTATGTGTAGCCTTCCCAATGCAATGCTTTATGAGAGATATTAGCACGGCTGGCTTGGACCA
CACAACTTCAAGTGAAGCTTTGATGCACTTGGCCCTAAACTAATCCGTCAGCTCCTGCTCAAGGTTTCACTATTAAACAGGCTCCATCGT
AACAACTTCTTCACTACTGAATGTTTATATTTAGCAGTATTTCTCTAATCTTTTGCAGCGTCTCTTGGCCTGAGAATTTCTTACAAGGTTCA
TCATTTCTTGGGAGTCACTGCAATTTGCAATAGTGGAGGAAAGTAAAGTCCAGCTAGGTTGGAACACATGCGCATTTGTGAGGCCACCTGCCCCACA
GCCAGATCACTCTCTAAGAAATGAATACTCTTCCAGGGCTTTTGGCTCTCTTTGGACTCCATACACAGCACTGTCCACTGCTGCTAATGCC
ACCCAGGAATCCATTCCAGTGCATATTAAGAGACACAGTTTGGCCTGGAGAATGCACTGCACTCAGGAGACAGATGAACCTGGAGCTGGTTGC
CACATTTTCTCAATATTTAACAGACTGAAATCAGACACTAATTTCTGCTGTTCTCTGTGACGATGTAATAGACCAGAAAGTGGGATGAAGGA
ACCATGTTCTGTACTGGAAATGTTTACTTTGATAAAGATGCATCGAAATTTCTCCCTGTCGCAAAAGTGGATAATTTTGCCTTGGATAAAATC
AAGTAATATAGTGAATTTTGTCAATATATGGGCTTTTGGGGTAAACAAATAATTCAGAGTGTCTCCCACTAGCAAAAGCCTTATGTTATCAGTC
CAATCAATATAAGGTAACCTTGGCTGAGAGATGAGTATGCTATTGCTCGTAACCTTCCCTGGCTGATTTCTCTGGAAGATCTGGAGCATCAGT
TTTGACATTAACCTCCAGCACCTGCACTCCAGATGGAGATTAAGCACAAGGAAAGTACTCCATCATCAACAGGTTTACACTTTGCTTGGATCCA
AGTCAGATGCTCTTGGTTTACATCAATTTGTTGCAATCAGTGTACTGGGACTCTCTACCAACTGGTCAAGCGAATCTTAACTGCACTTGTAT
GSGATATGGAATCCAGGCTCAGSAAAAGGAGTAGSAAACAAATTCAGTTGTAGGGAGAGAGGACATATTTGATGCCAGGATTTCTGCTC
TTCAGAAAATCCACTGTAGACTTATGACTGTTACAGCAATAAAGGTAATGTTGTTAAATCTTCAAACCTGTAGTATGACAGTCTTGTACTG
TGTTCAGAAATCAAATGTGACTGAGCAATCCATTTATCAACATTTGTTTGCATTTGCTGTTTGCATCAITTTCTTTTTGATCATCTTTAAGTCTCTC
TATTTCAAATGTGATATAAAGCTCAGCCTCAGTACTTATTTATAAATACTTGTCTTATAGTAAATTTCAAATTTCTAAAGTCTTTGTAACC
AATGAATAATATTTCTGGCTCGATTGAGACAGAAAATGTTGGCAAGACATATCTTTAACTTCAAATAATGCGGTTCCAGTTGTTGAAAAGTCTCT
TATATTTAGCTTGTACTGCTACATACCATATCTAGGATTAAGCAGGAACTTGAAGTCAGGAAAAGAGATAATCCAAATGATCAATTTCTCTACCA
TGTCAAATCTGATCCTCAGGATCTATGAAAGTTAAGACAGTTTCTCTTTGGCTGGCTTCAAGTCTGCTCAATCAACGAAATAACTTAACTTTACGA
CTGCTGSGATATAAACAGGTTTGTCTGTATGAATGAAGAGAAATCCATTTGCATAGGTTATGGCATTCTTTGATTTTGAATAAGTCTTGTATAC
AATTTCAAATACACATAAAGAACTGGGTTTGTCTCCAGGCAATGTTTGGTGTATGTTAAGATTGACAGATTTTGGAAATTTATCTCTGAGGA
TAAATGAACATGGCTGAGGAGTAACTAAATTTTATCAGGATAACTTTAATAGAGATTGTTGCATCAAAATGCTTCAAGTATCCATAAATCTGAA
TCAATAATTTTCAAGTCTCCAAACAGGAATTTTGGTGTGAATGACATATGTTGCTCTGCTCCAGGTTTCCCAGGAAGATTAATAAAAT
AAAGTATTTCCAAAGGCCATGGTTGGAGTAGCAGCAAAACCCAGGATATA

Фиг. 18Е

SEQ ID NO:6 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:2

TTTTTAGCACAGTTTGAAGCAAACCTCAGGCTTAAATGATCAGTTTCTGTCCTCGTATTTCTTTCAAGCAAAGGCCATGTTTTGTAATACTCCAT
TCAATGACTGTTCTTCGGCTCCAGCAAACATTCCTAAGTGGTAGGTTGAGGAGGTTTCTAATTTATGTTTCCGGTGTCCAATAACCTGGAGG
AGTATCTGCTTCATGCCCTCAGGCTCATGTTATTTCAAGAAAGTTACAGCGTTTAAATCATTCTTAATAAAGCAAGTCCACTAATCTAAGTAA
AGTGAGCTTCAATAAAGCAGCTGTGAATGTTTAAAGACAATAAAGGAGAAAAAACAACCTCAACACACAGGAGTCCATAAGTGCAAAAC
TGATGACGCTGAATCAGGAATTTAGCATCCATTTAAAGAGATGTTCTCAGCAAATTCATTAATAGCTAAAAATGCTGACACCGATGAACAT
GTTGTGTCTAGGCCAGTATTCATCCAGGCTCAAGGAATCTAAAGGGTAGATGTAACCTGAAAGTGAATTTGTTTTATCTGGAGAGCTTTCC
CATAAATAGACTGCTTCTTCTTCAACGAGCTAGCGTAGTGAGGTTACCTTTAATGAAAGGATTTAGAGTCTTTTTAGCAACAGCTTCCCCA
GTTTTGTAGATATCCAGAAAGGTTGCTTGTACTTGACAAAAACATTTCTGTAGTGGATGATGATGATAAATTTAAGCATATGCAATCTCTGG
GTTACATGCTGTTTTCTTAGTCTCTGACAGATTTGTCAGATCCAATTTCTGCAATTTGCCCAACATCAGCTCTACACTGACAGCTGGCTCTT
CACAGACTTTCTGAATTTGATATTGGAAGTGCTATAAAACATGTCACACTGTTTATCTGGTCTGAGTATTCATACACTGTGAAAGTGGCAGGACTA
AGAAACCCAACTCAAGAGTTCAAAATCCGGAATCTGACACAAGGAAATCACTGGAGGGGATCGAATTCAGTTGCAAGATAACATGTCATCTT
TTATTTGGTAATCAGTGAATAGCTGATCCACCCCTCCACAAGAGCTTTAAGTCTTCTCAATTTGCAATTTGATTTCCAGTAGGCAAGGAGATGTCATCA
CTGCATGAGAGGATCCAGAAAGATGATTTCTTCTGGGCTGTAGCTGGACATGCTACTACTGCTTTGTAATCAGAGTTTCCGTAGCCTCTGTAG
TGGGATGCTTCAATATCTCGATGATCAATTTTCAAATAAAGGCTGCAAACTTCTCAGAGGACTGGTTTTGGAACACAGTTGATACATGACCGTGA
GCCAAGGCCCTCAAAATCTGTACTGACAACGAGGCTCATCTGAGAAGCACTCTACTGGCTCCCAAGGAAATTTGCTGCTGATTTATAAATTA
TGTAAGGGACTTTATGCTGTAAAGCAACATCGATGTCATATTCAGCGGAGCTGTTTAAACAGGAGTGAATTTCTGTCAGGCCCTCGATGGCAT
GATTTGTCTCTGGTTGAATAAAGCCACCTCCATCCCTGCTCTGATAGCCATTTGATGATTGGGTTAACATAATTTATGCTTTCAAGTTCAG
ACTGTGAGTAAAGCATAGGAGTGTCTTCAACATACGTCCTGACCAAGTGTAGGTACAGAGCTGCTTTATGTTGAGACTGCTTTCCAAACAC
GATAAATGGGTGATACCTTTAAACAAAGCTTCTCTCAAABCTGAAACAAATTAACAAAACACTGGGTGAGTTTTATCTCCAGGGAAAGAGC
ATAGGCAGAAAATGGCCAAATGAAAGGCTCTGAGGCTGGCAGTATTTCAAGCAGAAAGGTTGACCTTTAATGAGAGTGTGTTGATTTCTGT
AATTTTATGGTGTAGTACTGTGAATTTCTTGAAGGATCCATATCTAATGATAATTTCAACACGCCAATAAAGAAATACATAATTTGATTTGGT
TCTGCTCTACATATTTATGACTTGTCCAAGTACTCTTAAAGCAAAAGCTGTTAACCAAGTGTAGCACTGCAACCTTCCACAGCTGTAAAGAAATG
CAGCATTTCTGAGGACATAATGCTCACCATCCCTCTTTTAAATTTTCTCCAGGTTCCGCTTTCAATTAAGGGTGGAAATGAAATAATTTCAAGT
ATTTCTGTCTCAGGTAGTGAATAACATAGAAATCTGGGACAACGCTCATCAGCTCCGCTCTGCACTCCCTTTGGGAGGTTGGTTAGGATATGA
TGCCCTCCGACCTTGAACCTGACAGCAAGATCTCACTCAAGCAGTCTTTTACACTCAAATCTTTGATTTCTGTTTTGGGACCAAAATCTAATG
GTATCTGTATGGAACTCTTTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCATAAATACCCCTAGGATCCAAAGTAAATACCAGAAATAGCTTTCCCTTTTGA
CACCTTCTGGCACCCTGTAACGATTTTACTAGATTTCTTTCCAAACGAAGTCTCCAGTGAGAAATTTGATTTCTGAGGGCAATTTCCAGAGGA
AGCACAAGTAAAGGCTCACAAGTATTAGAGGAGCCCTCTACTTCTGTCGACACATTTGGAGGACTTTGCTCCCTGATGATCAATGACTGGGCTTCT
TGAAGTGCAGATTTCCCTCACAGCAGACATTTTAAACAGAACTGCAATCCAGAAAGTCTAATGTTTAAACAGTTCCCTTCAACTGGACCTGTTCTC
TGTACAACAGAAATATGTTATTTTCCAGGAAGACATCTTGAACACCTTTGCTTAAATGATCAGCAACACATATACCACTGTTTGAATGGC
AACACCTTGAATTTCCAGGTAGTTACAGAACTAGGTAGGGCAAACTGCAACTGTTTCTTCTGGGAACAAGATGAACCTCCATAACCAAGCTTTCTG
GAAATTAACCTCGAATTTCTGGCTTCTGTTACAGGGTCTCATGTGTAGCTTCCCAATGCAAGTCTTTATGAGAGTTATAGCACGGAGC
TGGCTTGGCAGCACACAACATTCAGTGAAGCTTTGACGCTCTCGGCCCTACACTAATCCGTGACGCTGCTGCTCACAGGTTTCAATCATGATTAAT
ACGGACTCCATCGTAACAACATTTCTCACTACTAAATGTTTATATTAGCAGCTATTTCTTCTTCTTGTAGCAATTTCTTGGGCTGATAATTT
CTTACAAGGTTCAATTTCTTGGGAGTCACTGATTTGCAATTTGATAGTGAAGGAAAGTGAAGTCCAGCTAGGTGGAACACATTTGGCATTTGAGGGCCA
CCACCTGCCCCACAGCCAGATCACTCTTCTAAGAAATGAAATACTTTTCCAAGGGCTTTTGGCTCTTCTTGGACTCCATACACAGCCTGCTGCA
CTGCTGTTAATGCCACCAGGAATCCATCCAGTTACCATATTAAGAGACACAGTTTGGCTGGAGAAATGATGATCTGATCAGGAGACAGATGAAC
CTGGAGCTGGTTGCCATTTTTCTCAATATTAACCAAGTGAATCAGACACTAATCTGCTGCTCTCTCTGACGATGTAATAGACCAAGGAG
TCCGGATGAAGGAACATGTTCTGCGTTACTGGAATGTTTACTTTGATAAGATGCACTGAAAGTTTCTCCCTGTGCAAGTGGATTAATTTTGC
CCTTGGATAAAATCAAGTAATATAGTGAGTTATTTGTCAATATATGGGCTTTGGGGTAAACAATAATCAAAATTTCTCCACTAGCAAAGCCT
TGTGGTTATCAGTCCAATCGATATAAAGTAACTTTGGCTGAGAGATGATGATGCTATTGCTGGTAAACCTTCCCTGGCCTGATTTGCTGCGGAAG
TCTGGAGCATGATTTGACATTAACCTCAGACCCGCTCACTCCAGATGGGAGATTAACCAACAACGAAGCTACTCCATCATCAACAGCTGTTACACT
TTTTCTTGGCTCCAAGTCAAGTGTCTTGGTTGACATCAATGTTTGTGCAATTCAGTGTACTGGGACCCCTCAACCACTGCTCAAGCCATCTTAA
ACCTGCACCTGATGGAATATGGAATCCAGGCTTCCAGGAAAAGAGGATAGCAACCAAATTCAGTTTGTAGGGAGAGAGGACATTTGATGCCA
GGATTTCTGCTCTCAGAAAATCCACCTGTAGACTCTATGACTGTTACAGCAATATAAAGTACTTGTGTTTAAATCTTAAACTGTAGTATGAC
AGTTCTTGACTGCTGTTCAGAATCAAATGTGACTGAGCAATTCATTTATCAACATTTGTTTGTGCTTGTGCTTGTGCTATCTTTGATCATC
TTTTAAGTCTTCTTATCCAAATGTGATATAAACATCAGCCTCAGTACTTATATAAAAAATCTTGCCTTTATAGTAAATTTCAAATCTTAA
AGTCTTATAACCAATGAAATTTACTTCTGGTTCTACTGAGACAGAAAAATGGCAAGACATATTTAACTTCAAATAAGTCCAGTTCCAGTTGTTG
AAAAGTCTCTTAAATTTAGCTGGATCCACATACCATATCTAGGATTAAGCGGAACTTGAAGTCAAGGAAAAGAGATAATTTCAATATGATCA
ATTTCTTCAACATGTCAATTTCTGATCTTCAAGATCTATGAAAGTAAAGACAGTTTCTTTTGGCTGCTCAAGTCACTTCAACGAATAAATCT
TAACCTTACTGATTTGGCTGGAGTATAAACAGGTTTGTCTGATGAATGAAAGGAAATCCATTTGATAGGTTATTTGGAATTTTTTGAATTTGAAA
AATGCTTTGATACAACTTCAAATACACATAAAGAACTGGTTTTGTCTTCCAGGTAATGTTTTGGTTGATTTGTTAAGACTGCCGAGTTTTGGAAT
TATTTCTGAGGATAAATGAACATGGCTGAGGAGTAACTAAATTTTTATCAGGATAACTTTAATAAGATTTGTTGATCAAAATGCTTCAAGTAT
CCATAAATTTGAATCAAAATGTTTTAGATGCTTCAACACGGAATTTTTGGTCTGAAATGACATATGTTGCTCCTGTCACCAAGTTTTCCAGG
AAGATTAATAAACAAGTATTTCCAAAAGGCCATGGTTGGAGGATAGCAGGAAATCATG

Фиг. 18F

SEQ ID NO:7 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:3

GAGTGC AAAAGTCAAGATTTTATGGCATTTCCTGCTTGGTATTTTCTTTCAAGCAAGGATATGTTTGATAAGGGGCTCAGTTCAGTGGGTCTCT
TCTTCGCGCCCAACCAACCCCTGACTCTTAACACTTACAGACTTGTTCAGTCTATTGGCACTGACATCTGATAGCCTTGGGGACTGTGTTTCGCC
TECCCTCAAGGCTATCCATTTCAAAAAGTCGTAACCTCACTAGCTTGTGCTTACTTAAAGAAAAGTGTATCTGATTCAGGCTAGGTTTCAAGCCAGA
GGAGGAGCAATCCCCCGCCGAGGAGGAACTTCCTGTCAGCAGAACTTTCAATTCACAGCTGTTTAAAAAGAGGCTTCAGCAAAAGTATTCAAAT
TCTCTGACAAATGCTTGACAGGATGGACACGTTGTCTGTGGGCCAATAATCAATCCAGGTTGGAGAACTAGAGGGTATATATACTGAAACTGAA
ATTGTGTTTGTATCGAGAACCTCTTGCCTCATTAATACTGCTTCCCTTCCAGGTTGGCATGGTACAGCTCATCTTTAATGAAGTGAAC
TCCGAATCTCATCAGCAGCTTCCCTGTTTTGTAAGTACCAAGAGGTCGAGTGTACTTGACAAAACATTTTCTCAGTGGCTGATGTATCTCTG
ACTTTATAAGCATATGCACTCTCTGTTTACAGGCTTCTCTTTCTGGAGTCTGCAGAGATGGCTACTTCTGCTGCGAGTTGGCCAGCATGCA
GCTTCCACACATGTGCAAGCTCTCTTACAGACTTCTGAAAGCTGTGTGCAAAATGCTATAAATCATGTGCTACTGTTCTGCTGTGATAC
TEGTACCCGTGAAGGTAGCAGGATTAGAAAACCACTTGGAAAAGTCAAATATCCGGAACCGGACACAGAGGAAATCTCTGGAGGGATCGA
ATTCAAGTTCAGAAATGACATGGCCATCTTGTATGTAATCAGTTAGTGTGATCCACTCTCCCAAGAGCCGTAATCTTCTCGTTTGTCTCC
GATTCCAGTCGGCAGTATATACCATTAAGTATGATGGGAGCCCGGATGTTGACTCTCTGCTGGCTGTAGCTGGCCACTGCTATTATGCGCT
TGAATCCAGAGTCACTGAGCCTGAAAGTGGCTGGATGCTTCAATATCTGGGTATCAATTTCAAGTAAAAGCTGCAAAATCTCAGAGACACTAAT
TTGTGAACCAAGTATTTACATATACTGTGCGCAAGCCACTGTGAGCCTGTGTCAGCAACAGGCTCATTTGAGAGATACCTCCACTGGCTCC
CAGGAAATGCTTCTGTACCTTACTTGTGGAAGTCACTTCTGTTTGTAGGCGACATTTGATCCATATCCAAATGAATTTGTTTAAACAGGAG
TGAATATTCTGTCAGGCTCGATGGCATTAACTGTATCTGGGTGGAATAAAGCCCTCCATACCTGCTCTCAGATAGCCACTGATGATGG
GGTTGGCTGAATTCATCTCAGTTTCAAGGCTGGAGCAAAAGCATAGGCTGGTTTCAACCATACCTGCTGTGGCTGCTGGCCACAGAGCT
GCTGGACGTTTGAAGGTTATCTCCAGTAAACGGTAAATGGCGGATCACCTTAAACAAAAGCTTCTTCTCAGGGCCGACACAAATAGACGAAAC
CTCGGTGGGTTCTGTCTCAAGGAAAGAGCATAGGCTACAATGGCCAGTGTGAAGGTGCTCTGGATGGCAGGGTGTTTTAAACAGGAAAGGAG
TCGGCTTATCTAGCCTGTGTGATTTCATGGTGGGCGCATATGTCAACTGCTTCTAATCCAAACAGAAAGGCTGAAAGATACAAAGTTTT
CTCTGGCTCAGCAGGCAAGTACCCTGTAATTTATGGTAGATATGGGAATTTCTTGAAGAGCCGTTTTCCAGCTGACATCTCAACAGCAG
CCATAGCAAGAGTTACAATGTAGTTCATCTCTTACACTTGGCCACTGTCCAGCACTCTCAGAGCAAAAGCTGTCAGCCAGGACTAG
CGCTGCCCTTCCACATGCTGTAGGAATAGTCAAGCTTCTGTAGGACATGACGCTCACCACCCCTGTTTATTTTTTCCAGGCTGTCTTT
ACTCAGTATCAGGATAGAAAATTTCCAAATGGTTTCTGCTTCCAGGCTAGTGGAAAACATAGAACACCCGAGCTGATGCTCAGCTGCTGCTG
CACTGCCCTTGGGAGGTTGGTTAGGATGTGATGCTTACTACAGAACCTGGACAAGAACTCCCTCAAGCAAGCTCTTTGACACTCAAAATC
CTTCAACTTTGGCTTGGGACCAATTAATGGGATCCTGTATGGAAATCTTCTGCTGTTAAACAAATACCAGAAATCCCTAGGGTCCAGAAATC
ACGCCGCTAGCTTCTCTTGTACTCTTGGCACTACCCGTAATGTCTTACTAAGATGCTTTTCCAAATGAGGTCTCTAGTGAAGTATTG
GAGTGAAGCCAAATTTCCAGAGGAAGCAGGGTGAAGTCAACCAAGTACTGACGAGCCCTCTATCTCTGGAACACACTCTGGAGGGCTGGA
GGTGTGAAGCTAGCAGCTGAGCTCTGAAAGTGCAGATCCCTCACAGCAGACATTTTAAACAGAACTTTGCTCCTGAGGCTCATATGTTGAA
ACAGTCTTCAATGGATGTTCTCTCCGCACAACAGAAATAGTATGTTTCACTCCAGGAAGACTTCTTGAACACCTTGGCTTGTATGATCA
GCAACACATATACCTTGTCTGAAATGCCAATGCTTGAATTTCCCAAGTCGTTAGTGAAGTCAAGCAGGCTGACCTGACGCTGTTTCTTTGGGAAAC
GCGATGAATTTCCATAGCCAGCTCTGGAAGTAGCTTGGATATCTGCTTCACTGTAACAGGCTTAAATGTGGATCTTCCAGTGGGA
CAGGTTTATGGGGCTTCTTTTGGGATCTTGTGCGAATAGTACAGCACTGTTGAAGGCCCTGATGCAAGAGGGCCCTAGTGAACCCGGGCCAC
TCGCTCTCACAGGTTCTGTAGAAAGTCACTCGGGCTCCGTCATAGCAGCATTTCTTGGCACATATGTTGTACTIAGCAGCTTGTCTCTTATTTG
TGCTTAGGAGATGCAAGTCTCTTGTGACTGAGAAATTTCTTCAAGAGTCACTCAGATTAATGGGAGTCACTGCTGTTTGGCTTGGTGAAGGAGT
GAGCCAGCTAGATGGAATACATGCTGCAATGTGATGGCCACCTGCCACAGCCAGGTCCTTTTCAATCCAAAGCTTGAAGACTCTTTGCT
GGCCCTTTGGCGTTTCCCTGGACTTATACACAGCTCTGTCCACTGCTGATAGTGTACCCATGAGTCTGCTCAGTCAACATGTCAAGGGACACAGT
TTGGCTGGAGAATACACATATCACTGGAGACAGATGGAGCTGGAGCTGGTTGCCACACTCTCTCAATATTTTCCAGACTGCGTCAAGCCACTA
ATTCTGCTGTTTGTCTCCCTGTGACTATGTAATAGACCAAGAGTCTGCTGAAAGCAACATGTTCTGTGCTCACTGGAATTTTATATTTGAAAGTTG
AGGAGAAAAGTTTCTCTTGTGCGCTACTGTACAATTTGGCTTTGGATAAAATCAAGTAAATATAGTGAAGTATTTTGTGCTATATAGGGCTCTTG
GGTAAACCAATAATCAGGTATTCTCCCAAGCATGGGCTTGTAGTTTTCACTCCAAAGCATGAAATGTAACCTTGGCTGAGAGACGATACCC
AATCTGCTGATCTTTGCTGGCTGATTTCCTGCGAAGTCTGGGTCACTGATGCTCAAACTTAGCACCTGACATTTGATGGGAGGTT
CAGCAACAAACAGTACTCCATCAGTGTCAAGTGTGATGCTCTTGTTCAGTCAAGTCAAGTGTCTTGTATTCACATGCACTGTTTGGCTCAG
AGTTACTGGGACCCCTCTACCGCTGCTGAGTGAATCTTAACTGTGCTTATGAAATGGAATCCCGGGCTTCCAGAAAAGAGGAGTAGCG
ACCAATTCAGTGTGATGGGAGAGAGGACATATTTGACTCCAGGATTTCTGCTCTTCAAAAATCCACTGAAAGATTCTGTGACTGTACTGCAAT
ATAAAGCTACTGTTGTTAAGTCTTCTAGACTGTTGTAGGACAGCTTTAACTGCTGTTTCAAGAAATCAAAAGAGATCTGAGCAACTCCGTCACCA
ACTTTGCGGCTGTGTGCTTTGTGCACTATGCTCTCTCATCTTTTATGCTCTCAATCCAAAAGGCACTACACTCAGCATCAGGTACCAC
TTTATATAAAAATATCTGCTTTCACAGTATTTCAAAGTCTTAAAGTTTTATAGCCAAATGAAGTCTTCTGATGTTCTATTGAAACAGAGAAATCGT
GGCAAGACATATCTTAAATTCAAAGTATGCAAGTCCAGTGTGTTGAAAATCTCTTATAGTTAGCTTTAATGTGCAAAACCCATCTGCGGATTA
GATGGAATCTTGAAGTCAGGAAAAGAGATAATCCGGTGAATCAATTTCTTCAATGTCAACTCTGATCCTTCCGGGCTATGAAAGTTAAGAC
AGTCTCCCGTTTGGCTGGCTTCAAAGTCTCACCCAGAGAAATAGACTGATCTTTACTGACTGGTCCGGCGTGAACAGGTTTGTCTGTATGGAATGA
AGAGAATCCATGTTATAGGTAATGGTATTTCTTGTATTTGAAAAGTGTGTTGACACAACCTCCAGATACACCTGAGAGACTGGGCTTTCTTCTC
TAGGAACTGATGTTGGCTGTAGTGTCAACAGTGCCTGCTTTGGAAATTTGTTTTCCGGGGACAATAACATAGCCTGAAGAGAAAGTGTGACTTTTT
GTGAGGATAGCTTTTAGAGAAAAGAGTTGCATCAAAATGCTTCAAGTGTAGCCATGACTTGAATACCACTTTTCCAGCAGCCGACCGGAGGAT
TTGGGTGCTGAAATGACGTAGGTTTGTCTGTCACAGTTTGTCTCAGGAAAATTAAGAGCAAAAGTATCCCAAGACCCATGCTGTGATGCG
GCATAAACCCATGGGCATGGCTCCTGTAACCACTTCTCTTAA

Фиг. 18G

SEQ ID NO:8 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:4

TACAGTTGAGTGCAGTCAAGCTTTTATGGCAATTTCTGCTTGGTATTTTCTTCAAGCAAGACCATGTTTCCTAAGGGGCTACAATTCAGTGT
AGTCTCTTCTCCGGCCCAACAACACCCTGGCTGCTAACCTTACAGACTTGTCCAGCTTATGGTGTCTGATGCTCAATAGCCTTGGGGGACCTGC
CTTCGGCTCTCCACAAGGCTATTTGTTTCAACAAGTAACTCTTCAACTACCGTTACTATAAAGAAAATGTATCCGATTCAGGCTAAGTTTCAAGC
GATCTGGCTCTAGGAGCCACCAACAGGAGTACCCGGGAAGGCCAGCAGCAGAACTTCTCAGGCAATTTTCAAGCAATTTAGAAAAGATGCTTTC
AGCGAACCTCGTCCAAATAGCTACAACCGCTTGGCAGGATGGACACCTGTGTCTGTGGGCAATATCAATCCAGTGGAGGAATCTAGAGGGTA
TATAACTTGAAGTGAAGTGTGTTGATCTGACAGAGCTCTTGGCCATGATTAATATTTGCTTTCACCAAGTTGGCGTGTGGTACAGCTTATC
TTTTAATGAAGGTGATCTCAGAGTCTTCTCAGCAGCGGCTTCCCTGTTTGTAAATATCCAGAAGCCTCGCAGTACTTGACAAAATGTTTTCT
TCCGTGGCCGACGTGATCTGACCTTATAAGCATATGCAACTCTGGTTTACATGCTGTTTTCTTCTGTGTGTCTGACAGAGATGGCCAGTCCAGTCT
GCCTGCAGTGGCCCAATCAGCTTCAACGCTTGTGATGCCGCTCTCCACAGACTCTCTGAAGSTTGGTGTGACAGAGTGTGTAATCTGATGACA
CTGCTTATCTGTGTGATCTCTGACCCGTAACGCTAGCAGGATTCAGAAAACCAACTTGGAAAAGTTCAAATATCCGGAACCCAAACACAAGG
AAATCTCTGGAGGAATCGAATCAATTGCAGATAACATGACTGCTTTGATCTGGTAATCAGTTAGGAGTTGATCTACTCTCCACAAGAGCTCG
TAAATCTCTTGGTTTCTCCGATCCCGCTGGCAGCAGTATCACTTACTGCTAGGAGGACCCAGATGCTGACTCTCTTCTGGCTTGTAGCT
GGCACAGGCTATTATGCGCTTGTGTCCGAGTCACTGAGCTGAGGTAGCTGGAGGCTCAACTTCTTGGGTATCAATTTCAAATAAAAGCTGCAA
AATCTCTCAGCAGACTAGTTTGTGAACCAAGTTTACATATACTGAGCCAGCCACTGCTATAGCCTGTGGTACGATGAGGTACATCTTGGAG
GGGTACTCTCAGGCTCCCGAGGAAGTTCTCTGTCACTTATACTGGTAGAAAATCCCGCTTGTGTTGTAGGAGACATTGATATCCATATCCAA
ATGAAGTGTAAACAGGAGTGAATACTGTGACGGCCCTGATGGCGTTAATGATCTGTGGTGAATAAAGCCGCTCCATACCTGCTCTCT
CAGATAGCCACTGATGATCGGTTGACATAACTGCTCTTCAAGTTCAAGCTGTGAGCAAAAGCAATAGGCCGTTCTACCATACTGCTGTGTG
CCGCTTGTGGTGTGACTGTGGAAGTTGGAGAGTGTCTTCCAGAAACGGTAAATGGGCGGCTCTCTTAAACCAAGCTTCCCTCTCAAGG
CTGACACAATAGAACGAACTTCCGGTGGGTTCTGTCTCCAGGGGAGAGACTAGGCCACAATGGCCAGGGTGAAGGTGCTCTTGGAAAGGCAAG
GTCTCTTCAAGTAGGAAGGAGTCAAGCTTAGCCAGCGCTGTAGATTTTCTCCGTTGGGCATATGCCAATAGCCTTCTAAATCCAAACAGAAA
GGCTGAAGATATAAAGTGTCTCTGGGCTCAGCAGGCAAGTACCCCTGAATTTAATGGTAGATATTGGAAATTTCTTGAAGATCCGTTTCT
CAGCTGACACTTCAATCAGCCATAACAAGGAGTTACAGATCGAGTATTGCTCTTGTTCACACTGTTCAECTGCCAAGCACTCTCAGAGCAAA
AGCTGCAGCCAGCAGTACAGCTGCTCCCTCCACATGCTGTAGGAATAGTCAGCGTTTCTGTAGGACATGACGCTCACCAGCCCTCTTTTATTT
TTCTGAGGCTCTGTTTCTAGCTAACGTATCAGGGTGGAAAATATCCAAATGGTTTCTGCTTCCAGGTAATGGAAAACCTAGAACACCCGGACTA
TGCTCATGATTTCTGCTCGGCGCTGCCCTTGGGAGGTGGGTTAGGATGTCATGCTTCTTACTCAGAACCGTGGACAAGATTTCCCTATAAGC
AGTCTTTTACACTCAAAATCCTTTGACSTTGGTTTGGGACCAATCTAATGATCTGATAGGAAATCTTCTGCTGTAAACATACCAATAA
ACTCCCTGGGTCAGAGTCAACACAGCATAGCTTCCCTTTGATCCCTCTGGCACTACCCGTAATGCTTCACTAAGATTTCTTCCAAATGAAG
TCTCTAGTGAAGTTTATGGAGTGAAGGCCAATTTCCAGAGGAAGCAGGCTGAAGTCAACAGTCACTGGAGGACCCCTCTATTCTCTGCGCCA
CACATCTGGAGGACTAGAGGTCTGAGGGCTAGCAGCCGAGCTTCTGGAGTGCAGATTTCCCTCCAGCCGAGACATTTAACACAGAACTTGTCCC
AGAGGCTCTAATTTGAAACGGTTCCCTTCAATGGATGCTCCCTCTCAACAGAAATAGGATGTTTCACTCCAGGAAGACATCTTTGAAAC
CTTTGCCCTGAGTGTGTAGCAACACATATACCTTGTCTGATGCTGCTGCTTGAATTTCCAGGTCGTCAGTGAAGTCAAGCTTCAACTGCA
TTGGAAACTCTTTGCAAGGCTTTTGGCTTTCCCGGACTCATAACAGCGCTGTCCACCCGAGATAGTGGCAACCAATGAGTCTGCTCAGTCA
CATGTCAAGGGACACAGTTTGGCTGGAGAAATACACGCTTTATCTGGAGACAGATGACCTGGAGCTGGTTGCCACACTTCTCTCAATGTTATCC
AGACTGGTCAAGCCACCAATCTGTGTGTGCTGCTCCCGGAGTGTGTTGTTTCTGGGCTCCATACAGCAATTTCTTGGGACACCGTGTGTTATGAGCAG
GTTTATATTTGATAAGATGAATAGAGAAATTTCTCTTTGTGCCATAGTACAAATTTGCCCTTGGATAAAATCAAGTAATATAGTGAATTTT
GTCAATATATGACTTGGGGTACGATAATATTCAGATATTCTCCACAGCATGGGCTGTAGTTTTCAGTCCAGCCAATGTAATGTAACCT
GGCTGAGGGATGAGTATGTAAGTCTCATATTTCTGCTGGCTGATTTTCTCGGAAAGTTCCGGGGCATCAGTTTGTACCTCAAACTCAGTGT
GTCACCTTGTGATGGAGGTTCAACACAATGAAAGCTCAATCAGCAGAGTGTGTGATGCTCTTGGTTCCAAAGTCAAGATGCTCTGATGATC
ATTGACTGTTTGGCCATCAGAGTTACTGGACCCCTCTACCAACTGCTCGAGTGAATCTTAACTGTACCTTGTATGGAAAATGGAATCCCAAGGCT
TCAGGAAAAGGGGTAGCCACCAATTCAGTGTATAGGAGAGAGGACGTAATTTGATGCCAGGAATTTCTGCTCTTCCGAAAACCCACTACAA
GGCAGCAAGCACTGATTAATGTTTCCGAAAAGATGATGGCGGCTGTAGGACATCTGTGGTCTCTGTGCTATCCAT

Фиг. 18H



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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