

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046901**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.07
- (21) Номер заявки
202090893
- (22) Дата подачи заявки
2013.12.05
- (51) Int. Cl. *A61K 31/7115* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
C12N 15/113 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ С ИРНК К PCSK9 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

- (31) **61/733,518; 61/793,530; 61/886,916;
61/892,188**
- (32) **2012.12.05; 2013.03.15; 2013.10.04;
2013.10.17**
- (33) **US**
- (43) **2021.06.30**
- (62) **201591075; 2013.12.05**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**
- (72) Изобретатель:
**Бородовский Анна, Каллантхоттатхил
Раджив Г., Фитцджеральд Кевин,
Франк-Каменетски Мария, Куэрбс
Уилльям, Майер Мартин, Хариссе
Клаус, Кучиманчи Сатиянараяна,
Манохаран Мутхиах, Милстейн
Стюарт (US)**
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) **WO-A2-2012058693
US-A1-20070173473
FRANK-KAMENETSKY Maria et al.
Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers
plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in
nonhuman primates. PNAS, 2008 Aug 19; 105(33):
11915-11920, реферат, фигура 1**

-
- (57) Изобретение относится к средствам для RNAi, например двухцепочечным средствам для RNAi, нацеленным на ген PCSK9, и способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии PCSK9 и способам лечения субъектов с нарушением липидного обмена, таким как гиперлипидемия.
-

B1

046901

046901

B1

Родственные заявки

Изобретение заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/733518, поданной 5 декабря 2012 г.; предварительной заявки на патент США № 61/793530, поданной 15 марта 2013 г.; предварительной заявки на патент США № 61/886916, поданной 4 октября 2013 г.; и предварительной заявки на патент США № 61/892188, поданной 17 октября 2013 г. Данное изобретение также является родственной предварительной заявкой на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых предварительных заявок на патенты, таким образом, включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящее изобретение 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 29 октября 2013 г., имеет название 121301-00420_SL.txt, и ее размер составляет 433512 байт.

Уровень техники

Пропротейн конвертаза субтилизин/кексин 9 (PCSK9) является представителем семейства субтилизиновых сериновых протеаз. Другие восемь субтилизиновых протеаз млекопитающих, PCSK1-PCSK8 (также называемых PC1/3, PC2, фурин, PC4, PC5/6, PACE4, PC7 и S1P/SKI-1), являются пропротеин конвертазами, которые обрабатывают широкий спектр белков секреторного пути и играют роль в различных биологических процессах (Bergeron, F. (2000) *J. Mol. Endocrinol.* 24, 1-22, Gensberg, K., (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 11-17, Seidah, N. G. (1999) *Brain Res.* 848, 45-62, Taylor, N. A., (2003) *FASEB J.* 17, 1215-1227 и Zhou, A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20745-20748).

Выдвигалось предположение, что PCSK9 играет роль в метаболизме холестерина. Экспрессия мРНК PCSK9 подавлялась у мышей при помощи диетического в отношении холестерина питания (Maxwell, K. N., (2003) *J. Lipid Res.* 44, 2109-2119), активировалась статинами в клетках HepG2 (Dubuc, G., (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454-1459) и активировалась у трансгенных в отношении белка, связывающего стерол-регулирующие элементы, (SREBP) мышей (Horton, J. D., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12027-12032), как и в случае с ферментами, участвующими в биосинтезе холестерина, и рецептором липопротеинов низкой плотности (LDLR). Кроме того, как было обнаружено, миссенс-мутации в PCSK9 ассоциированы с формой аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии (Hchola3) (Abifadel, M., et al. (2003) *Nat. Genet.* 34, 154-156, Timms, K. M., (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353, Leren, T. P. (2004) *Clin. Genet.* 65, 419-422). PCSK9 может также играть роль в определении уровня холестерина LDL в общей популяции, поскольку виды однонуклеотидного полиморфизма (SNP) были ассоциированы с уровнями холестерина у населения Японии (Shioji, K., (2004) *J. Hum. Genet.* 49, 109-114).

Типы аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии (ADH) являются моногенными заболеваниями, при которых у пациентов проявляются повышенные уровни общего холестерина и холестерина LDL, ксантомы сухожилий и преждевременный атеросклероз (Rader, D. J., (2003) *J. Clin. Invest.* 111, 1795-1803). Патогенез типов ADH и рецессивной формы, аутосомно-рецессивной гиперхолестеринемии (ARH) (Cohen, J. C., (2003) *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 121-127), объясняется нарушениями поглощения LDL печенью. ADH может быть вызвана мутациями LDLR, которые препятствуют поглощению LDL, или мутациями в белке на LDL, аполипопротеине В, который связывается с LDLR. ARH вызвана мутациями в белке ARH, который необходим для эндоцитоза комплекса LDLR-LDL посредством его взаимодействия с клатрином. Таким образом, если мутации PCSK9 являются каузативными в семействах Hchola3, то, видимо, PCSK9 играет роль в опосредованном рецептором поглощении LDL.

Исследования сверхэкспрессии указывают на роль PCSK9 в регулировании уровней LDLR и, таким образом, поглощении LDL печенью (Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Опосредованная аденовирусом сверхэкспрессия PCSK9 мыши или человека в течение 3 или 4 дней у мышей приводила к повышенным уровням общего холестерина и холестерина LDL; данное воздействие не прослеживается у нокаутных по LDLR животных (Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Кроме того, сверхэкспрессия PCSK9 приводила к резкому сокращению количества белка печеночного LDLR без влияния на уровни мРНК LDLR, уровни белка SREBP или отношение ядерного белка SREBP к цитоплазматическому.

Несмотря на то, что гиперхолестеринемия сама по себе является бессимптомной, длительное повышение сывороточного холестерина может приводить к атеросклерозу. Постоянно повышенный в течение десятилетий сывороточный холестерин способствует образованию атеросклеротических бляшек в артериях, что может привести к прогрессирующему стенозу или даже к полному закупориванию затронутых артерий. Кроме того, меньшие бляшки могут отрываться, и вызывать образование тромба, и перекрывать ток крови, приводя, например, к инфаркту миокарда и/или инсульту. Если образование стеноза или закупоривание постепенные, то кровоснабжение тканей и органов медленно сокращается до тех пор, пока не нарушаются функции органа.

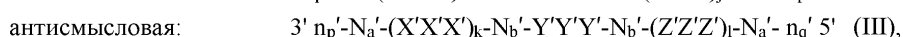
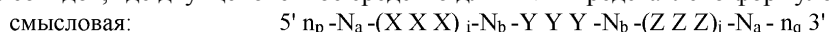
Соответственно, в данной области существует потребность в эффективных средствах лечения ассо-

цированных с PCSK9 заболеваний, таких как гиперлипидемия, например, гиперхолестеринемия.

Краткое описание изобретения

Как описано более подробно ниже, в данном документе раскрыты композиции, содержащие средства для RNAi, например, средства, представляющие собой двухцепочечную иРНК, нацеленные на PCSK9. Также раскрыты способы применения композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии PCSK9 и для лечения патологий, связанных с экспрессией PCSK9, например, гиперхолестеринемии.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III):



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

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

каждая 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;

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

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

каждая 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 нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте осуществления i равняется 0; j равняется 0; i равняется 1; j равняется 1; как i , так и j равняются 0 или как i , так и j равняются 1. В другом 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.

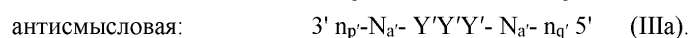
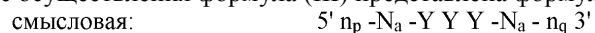
В одном варианте осуществления XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y', и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

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

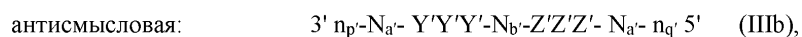
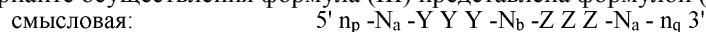
В одном варианте осуществления мотив Y'Y'Y' находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой нити от 5'-конца.

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

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

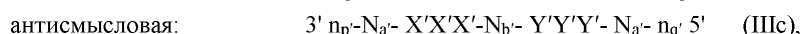
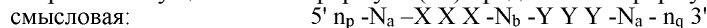


В другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):



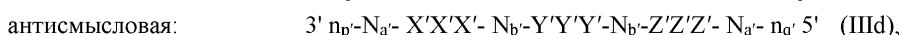
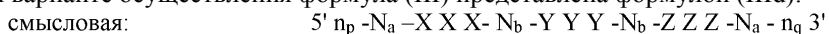
где каждая N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

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



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

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



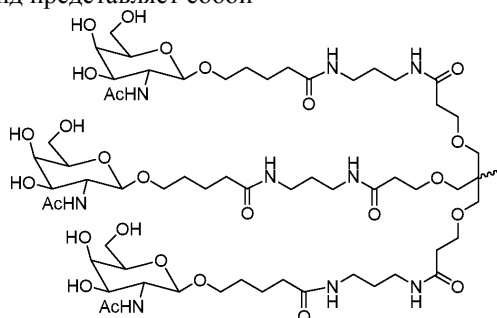
где каждая N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, и каждая N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

дов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-23 пары нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-25 пар нуклеотидов. В одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 23-27 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 19-21 пару нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 21-23 пары нуклеотидов. В одном варианте осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов.

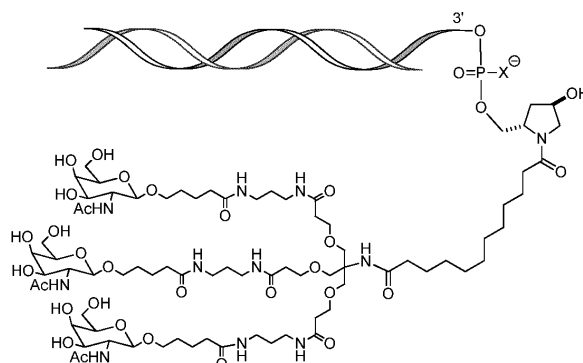
В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезокси, 2'-гидроксила и их комбинаций. В другом варианте осуществления модификациями нуклеотидов являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации.

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



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

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



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

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 нити. В одном варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити. В одном варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити. В одном варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить.

В одном варианте осуществления пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой нити 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 $r' > 0$. В другом варианте осуществления $r' = 2$.

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 нить содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посред-

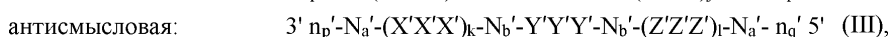
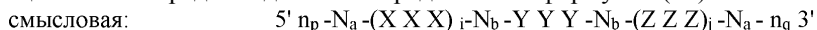
ством фосфотиоатной связи.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, перечисленных в табл. 1, 2, 9, 10, 12 и на фиг. 12.

В одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-53815, AD-56663, AD-56658, AD-56676, AD-56666, AD-57928 и AD-60212.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III):



где каждая из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждая из p, p', q и q' независимо равняется 0-6; каждая 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;

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

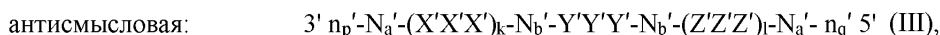
каждая n_p, n_p', n_q и n_q' , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждая 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 нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III):



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

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

каждая 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;

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

каждая 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 нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом. В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для 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 каждая из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1;

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

каждая 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;

каждая 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;

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

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

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для 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 каждая из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждая n_p, n_q и n_q' , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждая 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;

каждая 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;

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

каждая 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 нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa),

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

каждая 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;

каждая 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;

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

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

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

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

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает средство для RNAi, выбранное из группы, состоящей из средств для RNAi, перечисленных в табл. 1, 2, 9, 10, 12 и на фиг. 12.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят при помощи фармацевтической композиции.

В предпочтительных вариантах осуществления средство для RNAi вводят в растворе. В некоторых таких вариантах осуществления siRNA вводят в небуферном растворе. В одном варианте осуществления siRNA вводят в воде. В других вариантах осуществления siRNA вводят при помощи буферного раствора, такого как ацетатный буфер, цитратный буфер, буфер с проламином, карбонатный буфер или фосфатный буфер или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления буферным раствором является забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат липидный состав. В одном варианте осуществления липидный состав включает LNP или ХТС. В другом варианте осуществления липидный состав включает МСЗ.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке. Способы включают приведение в контакт клетки со средством для RNAi, например двухцепочечным средством для RNAi, или вектором согласно настоящему изобретению и поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления мРНК-транскрипта гена PCSK9, ингибируя, таким образом, экспрессию гена PCSK9 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления экспрессию PCSK9 ингибируют по меньшей мере примерно на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта с нарушением, опосредованным экспрессией PCSK9. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухцепочечного средства для RNAi, или вектора согласно настоящему изобретению, таким образом, осуществляя лечение субъекта.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления у человека имеется гиперхолестеринемия.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят в дозе от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 до примерно 30 мг/кг, от примерно 10 до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 до примерно 25 мг/кг, от примерно 15 до примерно 30 мг/кг или от примерно 20 до примерно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в режиме дозирования, который включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг пять раз в неделю, и где фаза поддержания включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг один раз, два раза или три раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза примерно каждые 12 ч, одного раза примерно каждые 24 ч, одного раза примерно каждые 48 ч, одного раза примерно каждые 72 ч и одного раза примерно каждые 96 ч.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения гиперхолестеринемии у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества

средства для RNAi, например двухцепочечного средства для RNAi, или вектора согласно настоящему изобретению, таким образом, осуществляя лечение субъекта.

В одном варианте осуществления субъектом является примат или грызун. В другом варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят в дозе от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг или от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг. В другом варианте осуществления двухцепочечное средство для RNAi вводят в дозе от примерно 10 до примерно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в режиме дозирования, который включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения включает введение дозы 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг пять раз в неделю, и где фаза поддержания включает введение дозы 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг один раз, два раза или три раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза примерно каждые 12 ч, одного раза примерно каждые 24 ч, одного раза примерно каждые 48 ч, одного раза примерно каждые 72 ч и одного раза примерно каждые 96 ч.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают определение LDLR-генотипа или -фенотипа субъекта.

В одном варианте осуществления введение приводит к снижению уровня сывороточного холестерина у субъекта.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают определение у субъекта уровня сывороточного холестерина.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий, что при всех трех протестированных дозах наблюдается дозозависимый эффект при введении AD-48400, конъюгированного с GalNAc. AD-48399, конъюгированный с GalNAc, служит в качестве контроля.

Фиг. 2A и 2B представляют собой графики, показывающие эффективность и длительность ответа *in vivo* для указанных siRNA.

На фиг. 3 представлена таблица, показывающая последовательности смысловой (SEQ ID NO: 1633-1642, соответственно, в порядке встречаемости) и антисмысловой (SEQ ID NO: 1643-1652, соответственно, в порядке встречаемости) нитей дуплексов, анализируемых в отношении эффективности *in vivo* и для оптимизации прототипа.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий результаты анализов эффективности *in vivo* для оптимизации прототипа.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий результаты анализов эффекта дозы *in vivo*, выполненных на трансгенных по PCSK9 мышах. Уровни белка PCSK9 определяли при помощи ELISA через семьдесят два часа после введения разовой дозы 10 мг/кг, 3 мг/кг, 1 мг/кг и 0,3 мг/кг AD-57928.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий уровни белка PCSK9 в сыворотке трансгенных по PCSK9 мышей после введения AD-57928 в дозах 5×2 мг/кг во время "фазы насыщения" и в дозах 1×2 мг/кг или 2×2 мг/кг во время "фазы поддержания".

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий уровни белка PCSK9 в сыворотке трансгенных по PCSK9 мышей после введения AD-57928 в дозах 5×1 мг/кг во время "фазы насыщения" и в дозах 1×1 мг/кг или 2×1 мг/кг во время "фазы поддержания".

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий уровни белка PCSK9 в сыворотке трансгенных по PCSK9 мышей после введения AD-57928 в дозах 5×0,5 мг/кг во время "фазы насыщения" и в дозах 1×0,5 мг/кг или 2×0,5 мг/кг во время "фазы поддержания".

Фиг. 9 представляет собой график, показывающий результаты анализов эффекта дозы *in vivo*, выполненных на трансгенных по PCSK9 мышах. Уровни белка PCSK9 определяли при помощи ELISA через семьдесят два часа после введения разовой дозы 0,3 мг/кг siRNA.

Фиг. 10 представляет собой график, показывающий количество AD-57928 и AD-58895 на нанограммах печени мышей C57B6 дикого типа после введения разовой дозы 1 мг/кг AD-57928 или AD-58895.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий количество AD-57928 и AD-58895, выраженное как % теоретического количества в печени мышей C57B6 дикого типа после введения разовой дозы 1 мг/кг AD-57928 или AD-58895.

На фиг. 12A представлена таблица, показывающая средства, представляющие собой iPHK, соглас-

но настоящему изобретению, содержащие оптимизированные последовательности по сравнению с последовательностями AD-57928. На фиг. 12A раскрыты "смысловые" последовательности как SEQ ID NO: 1653-1658, соответственно, в порядке встречаемости и "антисмысловые" последовательности как SEQ ID NO: 1659-1664, соответственно, в порядке встречаемости.

Фиг. 12B представляет собой график, показывающий значения IC_{50} указанных средств, представляющих собой иРНК.

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий уровень указанных средств, представляющих собой иРНК, в печени мышей дикого типа после введения разовой дозы 1 мг/кг указанного средства, представляющего собой иРНК.

Фиг. 14A представляет собой график, показывающий количество белка PCSK9 в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшегося PCSK9 по отношению к уровням PCSK9 в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при $qdx5 + qwx3$.

Фиг. 14B представляет собой график, показывающий абсолютное количество белка PCSK9 в сыворотке низших приматов после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при $qdx5 + qwx3$.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшихся LDL по отношению к уровням LDL в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при $qdx5 + qwx3$.

Фиг. 16A представляет собой график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент среднего количества уровней LDL в предварительно отобранной крови, после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при $q1w$ и в дозе 1 мг/кг при $2xw$.

Фиг. 16B представляет собой график, показывающий количество белка PCSK9 в сыворотке по сравнению с количеством в предварительно отобранной крови низших приматов после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при $q1w$ и в дозе 1 мг/кг при $2xw$.

Фиг. 17A представляет собой график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент среднего количества уровней LDL в предварительно отобранной крови, после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при $2xw$ и разовой дозы 25 мг/кг. Последнюю дозу для группы 2 мг/кг при $2xw$ вводили на 36 день.

Фиг. 17B представляет собой график, показывающий количество белка PCSK9 в сыворотке по сравнению с количеством в предварительно отобранной крови низших приматов после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при $2xw$ и разовой дозы 25 мг/кг.

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшихся LDL по отношению к уровням LDL в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при $qdx5 + qwx3$.

Фиг. 19 представляет собой график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшихся LDL по отношению к уровням LDL в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при $qdx5 + qwx3$.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие средства для RNAi, например, средства, представляющие собой двухцепочечную иРНК, нацеленные на PCSK9. Также раскрыты способы применения композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии PCSK9 и для лечения патологий, связанных с экспрессией PCSK9, например, гиперхолестеринемии.

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.

Используемый в данном документе "PCSK9" относится к гену пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 или белку пропротеин конвертазе субтилизин/кексин 9. PCSK9 также известен как FH3,

НCHOLA3, NARC-1 или NARCl. Выражение PCSK9 включает PCSK9 человека, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI:299523249; PCSK9 мыши, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI:163644257; PCSK9 крысы, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI:77020249. Дополнительные примеры последовательностей мРНК PCSK9 легко доступны с помощью, например, GenBank.

Используемая в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена PCSK9, в том числе к мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

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

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

Выражения "иРНК", "средство для RNAi", "средство, представляющее собой иРНК", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, означают средство, которое содержит РНК в том значении, в котором это выражение описано в данном документе, и которое опосредует нацеленное расщепление 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 PCSK9 в клетке, например, клетке субъекта, как, например, субъекта-млекопитающего.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК PCSK9, с направлением расщепления целевой РНК. Не желая привязываться к теории, считают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Дайсер, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, 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 нити 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 PCSK9. Соответственно, выражение "siRNA" также используют в данном документе для объяснения RNAi, которая описана выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может быть одноцепочечной siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные средства для RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью, из RISC, который затем расщепляет 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 спосо-

бах согласно настоящему изобретению является двухцепочечной РНК, и в данном документе ее называют "двухцепочечным средством для 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 нити нуклеиновых кислот, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию по отношению к целевой РНК, т.е. гену PCSK9. В некоторых вариантах осуществления согласно 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 нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая или обе нити могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используется в данном описании, "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в области техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле типа siRNA, охвачены выражением "средство для RNAi" в контексте данного описания и формулы изобретения.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК PCSK9, направляя расщепление целевой РНК. Не желая привязываться к теории, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Дайсер, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, 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 нити 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). Используемый в данном документе "нуклеотидный выступ" означает неспаренный нуклеотид или нуклеотиды, которые выпячиваются из дуплексной структуры средства для RNAi, когда 3'-конец одной нити средства для RNAi выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот. "Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухцепочечного средства для RNAi нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство для RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухцепочечной по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на любом конце молекулы. Средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают средства для 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 нить" означает нить двухцепочечного средства для RNAi, которая включает участок, который, по сути, комплементарен целевой последовательности (например, мРНК PCSK9 человека). Используемое в данном документе выражение "участок, комплементарный части мРНК, кодирующей транстиретин" означает участок антисмысловой нити, который, по сути, комплементарен части последовательности мРНК PCSK9. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, тогда несовпадения наиболее допустимы в концевых участках и, если присутствуют, как правило, встречаются в концевом участке или участках, например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца и/или 3'-конца.

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

Используемое в данном документе выражение "участок расщепления" относится к участку, который расположен вплотную к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом мишени, по кото-

рому происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания на любом конце сайта расщепления и расположенных вплотную к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления 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 расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Как используется 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. Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, которые могут встречаться в организме. Например, комплементарная последовательность является удовлетворительной для обеспечения выполнения соответствующей функции нуклеиновой кислоты, например, RNAi. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для анализа комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Последовательности могут быть "полностью комплементарными" по отношению к любой, когда присутствует спаривание оснований нуклеотидов первой нуклеотидной последовательности с нуклеотидами второй нуклеотидной последовательности по всей длине первой и второй нуклеотидных последовательностей. Однако, когда первую последовательность в данном документе характеризуют как "по сути, комплементарную" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но, как правило, не более 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации, в то же время сохраняя способность гибридизоваться при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению. Однако, когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько одноцепочечных 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, используемые в данном документе, могут также включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, составленных не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из неестественных и модифицированных нуклеотидов, в такой степени, при которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности гибридизоваться. Такие пары оснований, составленные не по модели Уотсона-Крика, включают, без ограничения, неоднозначное или Хугстиновское спаривание оснований G:U.

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

Используемый 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 PCSK9) в том числе 5'-UTR, открытой рамке считывания (ORF) или 3'-UTR. Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК PCSK9, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей PCSK9.

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

Фраза "ингибирование экспрессии PCSK9", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена PCSK9 (такого как, например, ген PCSK9 мыши, ген PCSK9 крысы, ген PCSK9 обезьяны или ген PCSK9 человека), а также вариантов (например, встречающихся в природе вариантов) или мутантов гена PCSK9. Таким образом, ген PCSK9 может быть геном PCSK9 дикого типа, мутантным геном PCSK9 или трансгенным геном PCSK9 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена PCSK9" включает любой уровень ингибирования гена PCSK9, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена PCSK9, как, например, ингибирование по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере пример-

но на 30%, по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 55%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 65%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99%.

Экспрессию гена PCSK9 можно оценивать, исходя из уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена PCSK9, например, уровня мРНК PCSK9, уровня белка PCSK9 или уровней липидов сыворотки крови. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

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

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

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

"Ассоциированное с PCSK9 заболевание", используемое в данном документе, подразумевают как включающее любое заболевание, ассоциированное с геном или белком PCSK9. Такие заболевания могут быть вызваны, например, избыточным продуцированием белка PCSK9, мутациями гена PCSK9, аномальным расщеплением белка PCSK9, аномальными взаимодействиями между PCSK9 и другими белками или другими эндогенными или экзогенными веществами. Типичные ассоциированные с PCSK9 заболевания включают типы липидемии, например, типы гиперлипидемии и другие формы нарушения баланса липидов, такие как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, и патологические состояния, ассоциированные с этими нарушениями, такие как болезни сердца и болезни, протекающие с расстройством кровообращения.

"Терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении пациенту для лечения ассоциированного с PCSK9 заболевания достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией PCSK9, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении субъекту, который еще не испытывал симптомов ассоциированного с PCSK9 заболевания, или они еще у него не проявились, но у которого может иметься предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически"

чески эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

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

Выражение "образец", используемое в данном документе, включает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекте. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток 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 (или ее составляющих), полученную от субъекта.

II. иРНК согласно настоящему изобретению.

В данном документе описаны улучшенные двухцепочечные средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена PCSK9 в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, как, например, человек с нарушением липидного обмена, например, гиперхолестеринемией, и применения таких двухцепочечных средств для RNAi.

Двухцепочечные средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки.

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

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

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9)) *in vivo*. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Каждая нить средства для RNAi в длину может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая нить может составлять 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 нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухцепочечный РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство для RNAi." Дуплексный участок средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, дуплексный участок может составлять 14-30 пар нуклеотидов в длину, 17-30 пар нуклеотидов в длину, 27-30 пар нуклеотидов в длину, 17-23 пары нуклеотидов в длину, 17-21 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 для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих

цепей. 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 нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других линкеров, не являющихся основаниями.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства для RNAi независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том числе, без ограничения, с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (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 нити. 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 нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для 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 нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует у антисмысловой нити. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует у смысловой нити.

Средство для 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 нити или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или *vice versa*. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не желая быть связанными теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и выступ с 3'-конца антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в RISC-процесс.

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

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

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити. В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, 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 для RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо моди-

фицирован 2-О-метилом или 3'-фтором, например, при чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc3).

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланкирующей модификацией. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, тогда химические структуры могут быть одинаковыми или 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 нити, антисмысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Данная антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

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

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

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

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

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для 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 О-фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера, модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в 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 О может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в 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'-О-метилмодифицированных вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификации фосфатной группы, например, модификации фосфотиоата. Выступы могут не быть гомологичными с целевой последовательностью.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксидефтором, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Нити могут содержать несколько модификаций. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

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

В одном варианте осуществления N_a и/или N_b имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", используемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один на каждые два нуклеотида, или один на каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждая из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждая из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных моди-

фикаций в чередующемся мотиве, как, например, "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." или "CDCDCD..." и т.д.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловой нити, сдвинутый относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и *vice versa*. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в дуплекс dsRNA чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ABABAB" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "BABABA" от 5' - к 3'-концу нити в дуплексном участке. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "AABBAABB" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "BBAABBA" от 5'-к 3'-концу нити в дуплексном участке, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью присутствует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

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

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

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

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

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 нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой

нити, 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 для RNAi может дополнительно иметь две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

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

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

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



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

каждая из p и q независимо равняется 0-6;

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

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

каждая n_p и n_q независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

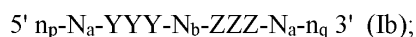
где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию; и

каждая 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 нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или вблизи него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

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 нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



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

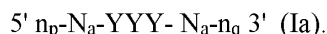
В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ic), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных

нуклеотидов. Каждая N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

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



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

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой нити RNAi может быть представлена формулой (II):



где каждая из k и l независимо равняется 0 или 1;

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

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

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

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

где N_b' и Y' имеют неодинаковую модификацию;

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

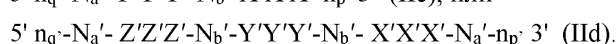
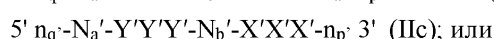
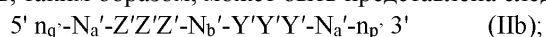
В одном варианте осуществления N_a' и/или N_b' имеет модификации чередующегося паттерна.

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

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 равняется 1.

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

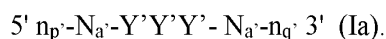


В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

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

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена как формула (IId), каждая 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 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 нить может быть представлена формулой



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

цированных нуклеотидов.

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

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

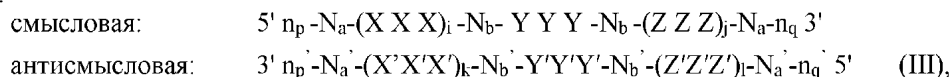
В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в 9, 10 и 11 положениях нити, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1^{го}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

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

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

Соответственно, средства для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить,

при этом каждая нить содержит от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс для RNAi, представленный формулой (III):



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

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

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

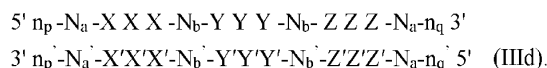
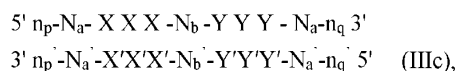
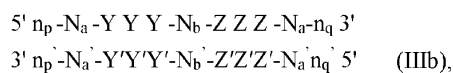
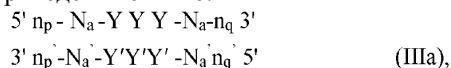
каждая N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

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

каждая 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 нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждая N_a независимо пред-

ставляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено в качестве формулы (IIIд), каждая 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. Каждая N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждая из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено в качестве формулы (IIIc) или (IIIд), 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 для RNAi представлено формулой (IIIд), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIд), 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 другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIд), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIд), 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 для RNAi представлено формулой (IIIa), модификациями N_a являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' 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 для RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIд), 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 для RNAi является мультимером, содержащим три, че-

тыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

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

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают 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.

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

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к 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 гетероатома (отличный от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть, например, углеводом, моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно, выбранный фрагмент соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, которая подходит для введения или связывания другого химического структурного элемента, например лиганда, с составным кольцом.

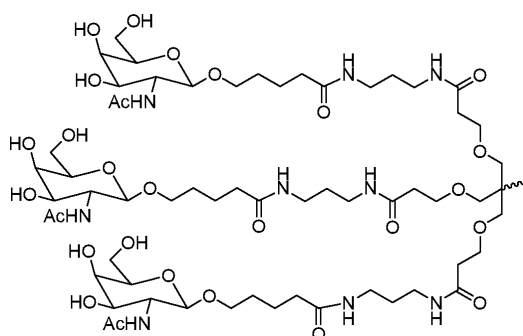
Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; предпочтительно, циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазина, [1,3]-диоксолана, 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 для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению является средство, выбранное из группы, состоящей из средств, перечисленных в табл. 1 и 2.

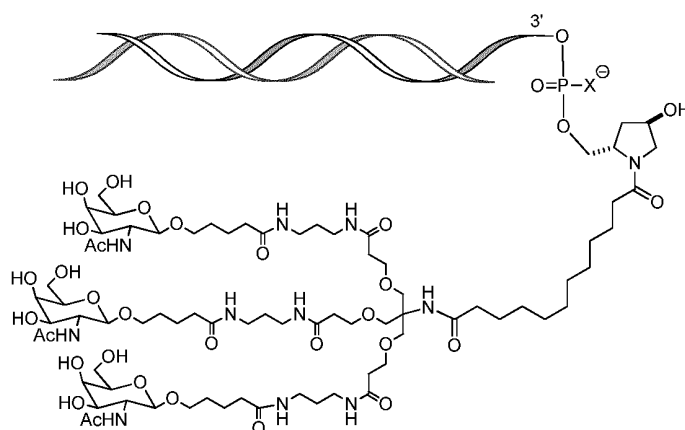
Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

A. Лиганды.

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



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



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

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

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

Некоторые лиганды могут иметь эндосомолитические свойства. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который проявляет рН-зависимую мембранную активность и фузогенность. В одном варианте осуществления эндосомолитический лиганд принимает активную конформацию при эндосомальном рН. "Активная" конформация является такой конформацией, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая будет претерпевать изменения в заряде или протонировании в ответ на изменения рН. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

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

Лиганды, как правило, могут включать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или "репортерные" группы, например, для отслеживания распределения; перекрестносшивающие средства и придающие устойчивость к нуклеазам фрагменты. Об-

щие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

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

Лиганды также включают нацеливающие группы, например, нацеливающее на клетку или ткань средство, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как клетка почки. Нацеливающей группой могут быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин В12, биотин, RGD-пептид, миметик RGD-пептида или аптамер.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилосигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеил)литохолевую кислоту, О3-(олеил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), помощники транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеотиды (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu³⁺ тетраазамакроциклы), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную глюкозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу или аптамеры. Лигандом, например, может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение средства, 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.

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

В одном аспекте лиганд является липидом или липидной молекулой. Такие липиды или липидные молекулы предпочтительно связываются с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или липидный лиганд может (а) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) 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 модулирования, например, регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, менее вероятно, что липид или липидный лиганд, который связывается с HSA более сильно, будет нацеливаться на почки и, таким образом, менее вероятно, что он будет выводиться из организма. Липид или липидный лиганд, которые связываются с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления липидный лиганд связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в ткани, отличной от ткани почек.

Однако, предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

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

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

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство для проникновения в клетку. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopodia. Если средством является пептид, то он может быть модифицированным, включая пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральным средством предпочтительно является альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазой.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную естественному пептиду. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять примерно 5-50 аминокислот в длину, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tug, Trp или Phe). Фрагментом, представляющим собой пептид, может быть пептид-дендример, стерически затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте фрагмент, представляющий собой пептид, может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS).

Иллюстративный содержащий гидрофобную MTS пептид является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 1). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 2)), 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 (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO: 3)) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 4)) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Предпочтительно, пептид или пептидомиметик, связанный со средством, представляющим собой иРНК, посредством введенной мономерной единицы, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Фрагмент, представляющий собой пептид, может характеризоваться длиной в пределах от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, такой как для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже. Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно использовать для нацеливания на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). RGD-пептид может способствовать нацеливанию средства, представляющего собой иРНК, на опухоли ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al.,

Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Предпочтительно, RGD-пептид будет способствовать нацеливанию средства, представляющего собой иРНК, на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например гликозилированным или метилированным, для способствования нацеливанию на специфические ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство, представляющее собой иРНК, к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001). Можно использовать пептиды, которые нацелены на маркеры, которыми обогащены пролифилирующие клетки. Например, содержащие RGD пептиды и пептидомиметики могут быть нацелены на раковые клетки, в частности, клетки, на поверхности которых присутствует интегрин. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно использовать другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для контроля пролифляции клеток и ангиогенеза. Предпочтительные конъюгаты с таким типом лиганда нацелены на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например, раковый ген, описанный в данном документе.

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, например, может быть α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Secorin P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например, α -дефенсин, β -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

В одном варианте осуществления нацеливающим пептидом может быть амфипатический α -спиральный пептид. Иллюстративные амфипатические α -спиральные пептиды включают, без ограничений, цекропины, ликотоксины, парадоксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаирины, бревинины-2, дермасептины, меллитины, плеуроцидины, пептиды H_2A , пептиды Xenopus, эскулентины-1 и цаерины. Некоторое количество факторов предпочтительно будет рассматриваться для поддержания целостности стабильности спирали. Например, будут использовать максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и будут использовать минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролин или циклические мономерные единицы). Будет рассматриваться кэспирующий остаток (например, Gly, представляющий собой иллюстративный N-кэспирующий остаток), и/или будет использоваться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной N-связи для стабилизации спирали. Образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными $i \pm 3$ или $i \pm 4$ положениями, может обеспечивать стабильность. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками, глутаматом или аспаратом.

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

Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, который способен нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер или аптамер. Кластер является комбинацией двух или более единиц сахара. Нацеливающие лиганды также включают лиганды интегрина рецептора, лиганды для хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCP II, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Лиганды также могут основываться на нуклеиновой кислоте, например, аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или может иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

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

PK-модулятор означает фармакокинетический модулятор. PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные PK-модуляторы включают, без ограничения, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкил-глицериды, диацил-глицерид, фосфолипиды, сфин-

голипиды, 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 примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов).

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

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

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

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

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

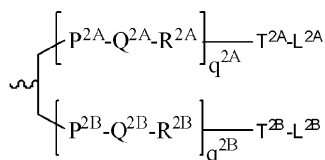
Что касается двухцепочечных олигонуклеотидов, то лиганды могут быть присоединены к одной или обоим нитям. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечное средство, представляющее собой иРНК, содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью. В других вариантах осуществления двухцепочечное средство, представляющее собой иРНК, содержит лиганд, конъюгированный с анти-смысловой нитью.

В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеосообразованиями, фрагментами, представляющими собой сахара, или межнуклеозидными связями молекул нуклеиновых кислот. Конъюгация с пуриновыми нуклеосообразованиями или их производными может происходить в любом положении, в том числе внутрикольцевых и внекольцевых атомов. В некоторых вариантах осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеосообразования присоединены к фрагменту конъюгата. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеосообразованиями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового основания могут быть замещены фрагментом конъюгата. Конъюгация с фрагментами, представляющими собой сахара, нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода фрагмента, представляющего собой сахар, который может быть присоединен к фрагменту конъюгата, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. 1' положение также может быть присоединено к фрагменту конъюгата, как, например, в абазическом остатке. Межнуклеозидные связи также могут нести фрагменты конъюгата. Что касается фосфоросодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфотиоатной, фосфодитиоатной, фосфорамидатной и т.п.), то фрагмент конъюгата может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому О, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеотидных связей (например, РNA), фрагмент конъюгата может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

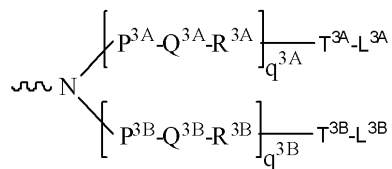
Можно применять любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд, хотя лиганд, как правило, представляет собой углевод например, моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

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

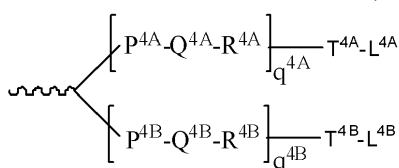
В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные любой из формул (IV)-(VII):



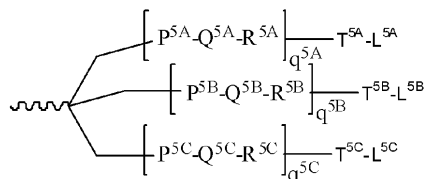
Формула (IV)



Формула (V)



Формула (VI)



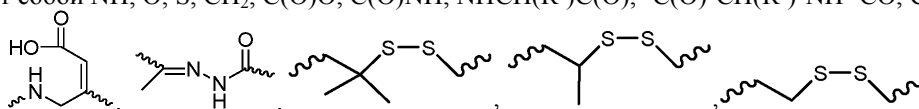
Формула (VII)

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

каждая из P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{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);

каждая 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,

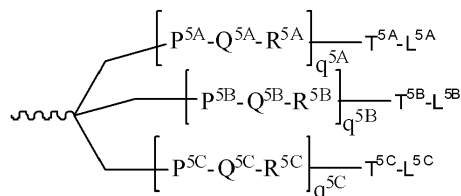


или гетероцикл;

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 (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и

R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

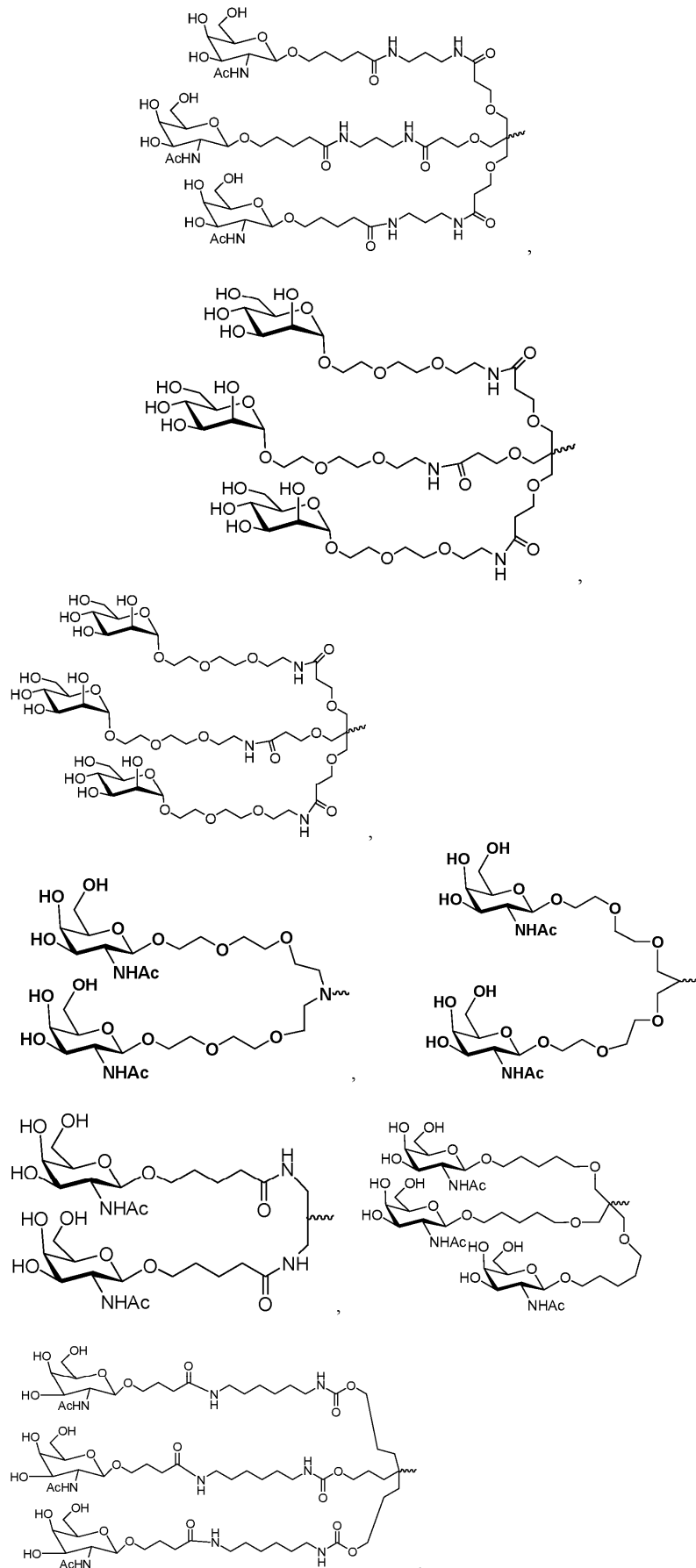
Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc в особенности пригодны для применения со средством для RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как производные формулы (VII):

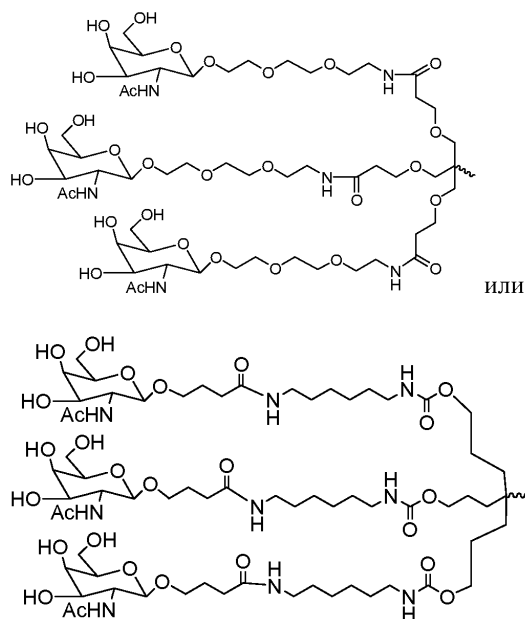


Формула (VII)

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

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





В других вариантах осуществления средство для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы, состоящей из AD-53815, AD-56663, AD-56658, AD-56676, AD-56666, AD-57928 и AD-60212.

III. Доставка иРНК согласно настоящему изобретению.

Доставку средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению к клетке например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с нарушением липидного обмена, таким как гиперлипидемия), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с иРНК согласно 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 согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5): 139-144 и WO 94/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в 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 генов при введении иРНК локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF путем как инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, MJ., et al (2004) Retina 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al (2003) Mol. Vis. 9:210-216) предупреждает образование новых сосудов в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухольная инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille, J., et al (2005) Mol. Ther. 11:267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолью (Kim, WJ., et al (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al (2007) Mol. Ther. 15:515-523). РНК-интерференция также была успешной при локальной доставке к ЦНС путем непосредственной доставки (Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602) и к легким путем интраназального введения (Howard, KA., et al (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) Nat. Med. 11:50-55). Что касается введения иРНК системно для лечения заболевания, РНК может быть модифицирована или, в качестве альтернативы, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа действуют для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возмож-

ным нацеливание композиции с иРНК на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательного нецелевого действия. Молекулы иРНК можно 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 нокаун 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 мышинных моделях рака предстательной железы (McNamara, JO., 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 взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо быть связанными с иРНК, либо на них воздействуют для образования пузырька или мицеллы (см., например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2): 107-116), которые заключают в себя 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, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN., et al (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS., et al (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY., et al (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME., et al (2008) *Pharm. Res.*, электронная публикация перед печатью 16 августа; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA., 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 согласно настоящему изобретению иРНК, нацеленные на ген PCSK9, могут экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную РСТ публикацию № WO 00/22113, Conrad, международную РСТ публикацию № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых 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 нить или нити иРНК могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В тех случаях, когда необходимо экспрессировать две отдельные нити с получением, например, dsRNA, тогда в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования). В альтернативном случае, каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, таким образом, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии с 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 от ряда коммерческих источников. Обычно предусмотрены такие 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, о временной трансфекции может сообщать репортер, такой как флуоресцентный маркер, как, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP).

Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена при помощи маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гигромицину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают, без ограничения, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авиопокс, например, канарипокс или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы с нарушенной репликацией. Различные векторы будут или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии иРНК, как правило, будут необходимы регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д. для обеспечения экспрессии иРНК в целевых клетках. 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-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена иРНК.

Можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Такие ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие 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). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для использования, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для использования в доставке иРНК согласно настоящему изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов к респираторному эпителию. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для 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 макак-резус. Дополнительные примеры использования аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); 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 кон-

струирования 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 согласно 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 согласно настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипокс, как, например, оспа кур или канарипокс.

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

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

V. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, пригодны для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена PCSK9, например, нарушения липидного обмена. Такие фармацевтические композиции составляют, исходя из способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса.

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

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

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

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена PCSK9. Как правило, приемлемая доза иРНК согласно настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 200,0 миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от примерно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве примерно 0,01 мг/кг, примерно 0,05 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 30 мг/кг, примерно 40 мг/кг или примерно 50 мг/кг на разовую дозу.

К примеру, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе примерно 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, или примерно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 до примерно 50 мг/кг, от примерно 15 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 30 до примерно 50 мг/кг, от примерно 35 до примерно 50 мг/кг, от примерно 40 до примерно 50 мг/кг, от примерно 45 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 10 до примерно 45 мг/кг, от примерно 15 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 30 до примерно 45 мг/кг, от примерно 35 до примерно 45 мг/кг, от примерно 40 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 10 до примерно 40 мг/кг, от примерно 15 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 30 до примерно 40 мг/кг, от примерно 35 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 10 до примерно 30 мг/кг, от примерно 15 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 10 до примерно 20 мг/кг или от примерно 15 до примерно 20 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

К примеру, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе примерно 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8,

9.9, или примерно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 до примерно 50 мг/кг, от примерно 15 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 30 до примерно 50 мг/кг, от примерно 35 до примерно 50 мг/кг, от примерно 40 до примерно 50 мг/кг, от примерно 45 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 10 до примерно 45 мг/кг, от примерно 15 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 30 до примерно 45 мг/кг, от примерно 35 до примерно 45 мг/кг, от примерно 40 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 10 до примерно 40 мг/кг, от примерно 15 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 30 до примерно 40 мг/кг, от примерно 35 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 10 до примерно 30 мг/кг, от примерно 15 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4 до примерно 20 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 10 до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 до примерно 20 мг/кг, от примерно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления dsRNA вводят в дозе от примерно 10 мг/кг до примерно 30 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, как, например, примерно 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 примерно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

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, их можно применять со средствами согласно настоящему изобретению. В таком варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее множество суточной дозы.

В других вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть дли-

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

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе, без ограничения, тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один период лечения или серию периодов лечения. Оценки эффективных доз и времени полужизни *in vivo* для отдельных 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 свертываемости крови, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем снижения экспрессии PCSK9. 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, мышь, содержащую трансген, экспрессирующий PCSK9 человека.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или же системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (например, при помощи трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или вдвания порошков или аэрозолей, в том числе при помощи ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например посредством вживленного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, подбололочное или интравентрикулярное введение.

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 использовать 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 фосфатидилэтанолламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеил фосфатидилэтанолламин (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-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C₁₋₂₀ алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмиристат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

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

на липосомы структурно подобна биологическим мембранам, при применении липосом к тканям бислой липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает 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 для RNAi, могут быть получены рядом способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для того, чтобы образовывались мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может быть амфипатическим катионным липидом или липидным конъюгатом. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат средства для RNAi затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со средством для RNAi и конденсируются вокруг средства для RNAi с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например путем диализа, с получением липосомного препарата средства для RNAi.

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). 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 для использования в качестве средств доставки размера включают разрушение ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно применять в тех случаях, когда желательны стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно единообразные агрегаты (Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Такие способы легко адаптируются для упаковки препарата средства для RNAi в липосомы.

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

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

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

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

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилау-

рат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, которые, как используется в данном документе, означают липосомы, содержащие один или несколько специальных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специальные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются те, в которых часть липидной составляющей, образующей пузырек, липосомы (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1} , или (В) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, в области техники полагают, что по меньшей мере для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженного поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Разнообразные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в данной области. Parahadjopoulos и соавт. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозидов G_{M1} , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon и соавт. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В 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 используют катионные липосомы. Катионные липосомы обладают преимуществом в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не могут сливаться настолько эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo*, и их можно использовать для доставки средств для RNAi к макрофагам.

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

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

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно использовать в комбинации с фосфолипидом с образованием пузырьков, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки сильно анионных нуклеиновых кислот в клетки культуры живых тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. В тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом, тогда суммарный заряд полученных комплексов является также положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают те, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермином, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и

дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбокиспермил-амид ("DPPE") (см., например, патент США № 5 171 678).

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

Липосомные составы в особенности подходят для местного применения, при этом липосомы проявляют некоторые преимущества по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие по отношению к высокой системной абсорбции введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в необходимой мишени и возможность вводить средство для RNAi в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используют для доставки средства для RNAi к эпидермальным клеткам и также для усиления проникновения средства для RNAi в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Была документально зафиксирована местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. 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., *Vroc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

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

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

Другие составы, применимые 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, пропоксиллированные спирты и этоксилированные/пропоксиллированные блоксополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как, например, омыляющие вещества, ацил-лактаты, ациламида 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 алкиламида, 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 согласно настоящему изобретению может также предусматриваться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы организованы в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекулы направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части соприкасающимися с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C₈-C₂₂-алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, глицерин, 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 диметиловый 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 согласно настоящему изобретению, может быть полностью инкапсулирована в липидном составе, например LNP, или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. LNP содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который приведен в РСТ публикации № WO 00/03683. Частицы согласно 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 нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыт, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и 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-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил-азанедирил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от примерно 20 до примерно 50 мол.% или примерно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-

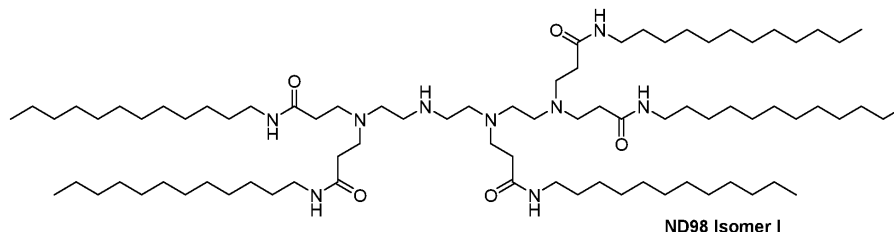
диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц липид-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки. В одном варианте осуществления 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), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоил-фосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароил-фосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от примерно 5 до примерно 90 мол.%, примерно 10 мол.% или примерно 58 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице, если холестерин включен.

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе, без ограничения, PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил (C_{12}), PEG-димиристоилоксипропил (C_{14}), PEG-дипальмитилоксипропил (C_{16}) или PEG-дистеарилоксипропил (C_{18}). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 до примерно 20 мол.% или примерно 2 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид дополнительно включают холестерин в количестве, например, от примерно 10 до примерно 60 мол.% или примерно 48 мол.% от 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 экстракции 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 1

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

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

Таблица А

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
LNP-1	1,2-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-дидиоленил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диооксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дидиоленил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диооксолан (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/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-(2-(бис(2-гидроксидецил)амино)этил)(2-гидроксидецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедирил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP22	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

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

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

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

Составы, содержащие LNP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны

в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

ХТС-содержащие составы описаны, например, в предварительной заявке США с серийным № 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № , поданной 10 июня 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/239686, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке № PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

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

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

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

Синтез ионизируемых/катионных липидов.

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

"Алкил" означает углеводород с прямой цепью или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Типичные насыщенные алкилы с прямой цепью включают метил, этил, 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 кватернизирован, в том числе бициклические кольца, в которых любой из вышеперечисленных гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, которые определены ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамин, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропимидинил, 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 $-SO_nNR_xR_y$.

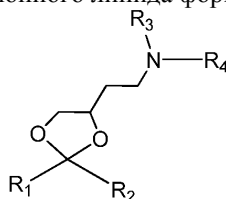
"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

В некоторых вариантах осуществления в способах согласно настоящему изобретению может потре-

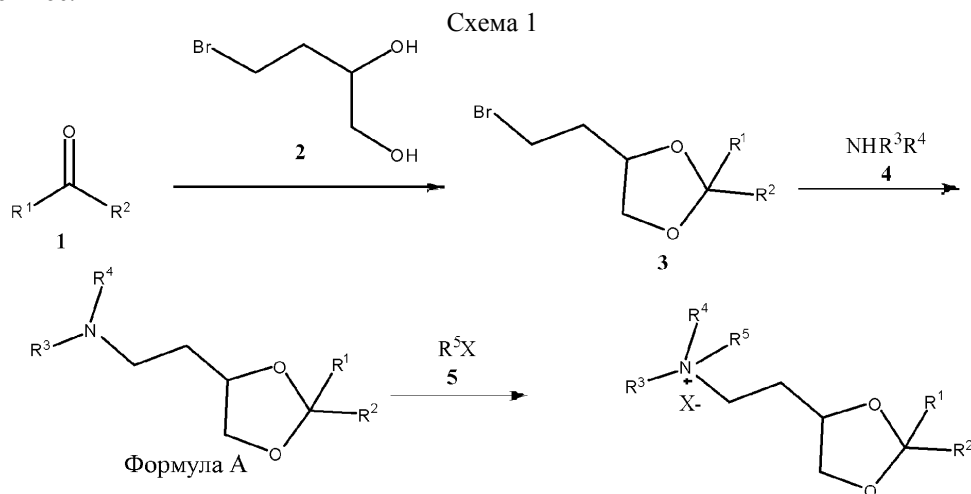
бываться использование защитных групп. Методика с использованием защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения 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 используют "защитную группу для спиртовой группы". "Защитная группа для спиртовой группы" представляет собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную химическую активность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять при помощи методик, хорошо известных в данной области.

Синтез формулы А.

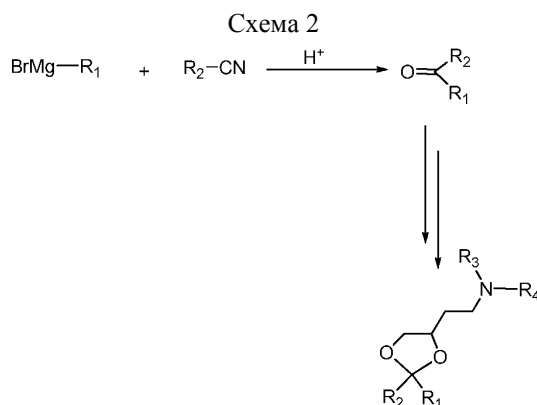
В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению составляют при помощи катионного липида формулы А:



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, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. 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 в при помощи следующих схем реакций 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.



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, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, может быть получен согласно схеме 1. Кетон 1 и бромид 2 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 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, противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или т.п.



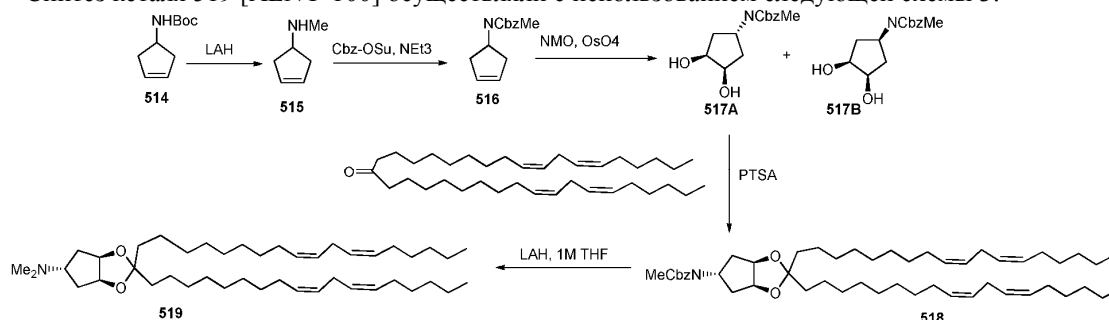
В качестве альтернативы, исходный материал, кетон 1, может быть получен согласно схеме 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы 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-диметиламиноасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной хлористоводородной кислотой, за которой следовал разбавленный водный бикарбонат натрия. Органические фракции высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли при помощи роторного вакуумного испарителя. Остаток проходил через колонку с силикагелем (20 г) с использованием градиента элюирования 1-5% метанол/дихлорметан. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и растворитель удаляли с получением бесцветного масла (0,54 г).

Синтез ALNY-100.

Синтез кетала 519 [ALNY-100] осуществляли с использованием следующей схемы 3:



Синтез 515.

К перемешиваемой суспензии LiAlH_4 (3,74 г, 0,09852 моля) в 200 мл безводного THF в двугорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моля) в 70 мл THF при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакцию смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до 0°C и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора Na_2SO_4 . Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали, и разводили 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl , и перемешивали в течение 20 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 (DMSO, 400 МГц): $\delta = 9,34$ (широкий, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Синтез 516.

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двугорлой RBF добавляли NEt_3 (37,2 мл, 0,2669 моля) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонил)-сукцинимид (20 г, 0,08007 моля) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч, определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно раствором 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 (m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (br., 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60 (m, 2H), 2,30-2,25 (m, 2H). LC-MS [M+H]⁺ -232,3 (96,94%).

Синтез 517A и 517B.

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моля) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в однокоревой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метил-морфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моля), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO₄ (0,275 г, 0,00108 моля) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч) смесь гасили при помощи добавления твердого Na₂SO₃ и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO₃ (1×50 мл), вода (1×30 мл) и в конце соляной раствор (1×50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na₂SO₄ и растворитель удаляли в вакууме. В результате очистки неочищенного материала при помощи колоночной хроматографии с силикагелем получали смесь диастереоизомеров, которые разделяли при помощи преп. HPLC. Выход: - 6 г неочищенного продукта. 517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). ¹H-ЯМР (DMSO, 400 МГц): δ = 7,39-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,72-1,67 (m, 4H). LC-MS - [M+H]⁺-266,3, [M+NH₄]⁺-283,5 присутствует, HPLC-97,86%. Стереохимию подтверждали при помощи рентгенограммы.

Синтез 518.

При помощи процедуры, аналогичной описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла. ¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ = 7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (brm, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65%.

Общая процедура для синтеза соединения 519.

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к охлажденному на льду раствору ЛАН в THF (1 М, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч, затем охлаждали опять на ледяной бане. Смесь аккуратно 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; электрораспыление MS (+ve): Молекулярный вес для C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺ вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

Составы, полученные либо при помощи стандартного способа, либо при помощи способа без экзотрузии, можно характеризовать одинаковым образом. Например, составы, как правило, характеризуют при помощи визуального осмотра. Это должны быть белесые прозрачные растворы, в которых нет агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц по размеру липидных наночастиц можно измерять при помощи рассеяния света, используя, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Размер частиц 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 LNP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от 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, микрочастица, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или минитаблетки. Могут быть необходимы загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. 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, гликоде-

зоксиколевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксиколевую 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; полиакрилатоакрилаты; полиоксэтанолы, 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, полидиэтиламиноэтилен (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), подоболоочечного, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как, без ограничения, вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из ряда компонентов, который включает, без ограничения, предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. В частности, предпочтительными являются составы, которые целенаправленно воздействуют на печень при лечении заболеваний печени, таких как гепатокарцинома.

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

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены в любой из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, пластичные гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

C. Дополнительные составы.

i. Эмульсии.

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

Block в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии o/w включают маленькие водные капельки, составляющие эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью, или она у них отсутствует. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае мазевых основ, подобных эмульсии, и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть 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, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и их рассматривали в литературе (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного 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, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные базы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий w/o, тем не менее сохраняя свою полутвердую консистенцию. Мелкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, неразбухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилат тристеарат.

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

Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

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

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

Применение составов эмульсий посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Составы эмульсий для пероральной доставки очень широко применяют из-за удобства составления, а также с позиции эффективности при абсорбции и биоуступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира находятся среди материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий o/w.

ii. Микроэмульсии.

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, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают путем сперва диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung 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. То, является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

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

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают, без огра-

ничения, ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиокиетиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации со вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и, таким образом, 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, Carmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C₈-C₁₂) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерилы, жирные спирты, полиглицеринизированные глицериды, насыщенные полиглицеринизированные C₈-C₁₀-глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

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

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях согласно 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 рассматривался выше.

iii. Микрочастицы.

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

iv. Вещества, способствующие проникновению

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 необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к обеспечению диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, можно классифицировать как принадлежащие одной

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

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

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-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 трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миистат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 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 (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 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-дикетонов (енамины) (см., например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Используемые в данном документе нехелатирующие неповерхностно-активные соединения, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию 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 согласно настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al., патент США №5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, USA), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США)

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

v. Носители.

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

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, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и т.д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, без ограничения, связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин,

сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и т.д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металла, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, натрия крахмалгликолат и т. д) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

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

Составы для местного применения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

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

vii. Другие компоненты.

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

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

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 нарушения свертываемости крови. Примеры таких средств включают, без ограничения, противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза. Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с 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 включает 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 IC_{50} (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 PCSK9. 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.

IV. Способы ингибирования экспрессии PCSK9.

Настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например двухцепочечным средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, ингибируя, таким образом, экспрессию PCSK9 в клетке.

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

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

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии PCSK9" означает ингибирование экспрессии любого гена PCSK9 (такого как, например, ген PCSK9 мыши, ген PCSK9 крысы, ген PCSK9 обезьяны или ген PCSK9 человека), а также вариантов или мутантов гена PCSK9. Таким образом, ген PCSK9 может быть геном PCSK9 дикого типа, мутантным геном PCSK9 или трансгенным геном PCSK9 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена PCSK9" включает любой уровень ингибирования гена PCSK9, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена PCSK9. Экспрессию гена PCSK9 можно оценивать, исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена PCSK9, например, уровня мРНК PCSK9, уровня белка PCSK9 или уровней липидов. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые связаны с экспрессией PCSK9, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена PCSK9 ингибируется по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 55%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 65%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена PCSK9 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 PCSK9 и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi согласно настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi согласно настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена PCSK9 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:

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

В альтернативном случае, ингибирование экспрессии гена PCSK9 можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена PCSK9, например, экспрессией белка PCSK9, к примеру, уровнем липидов, уровнем холестерина, например, уровнем LDLc. Сайленсинг гена PCSK9 можно выявить в любой клетке, экспрессирующей PCSK9 либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области. Печень является основным местом экспрессии PCSK9. Другие важные места экспрессии включают поджелудочную железу, почку и кишечник.

Доказательством ингибирования экспрессии белка PCSK9 может служить снижение уровня белка PCSK9, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, 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 использовать для оценки ингибирования экспрессии гена PCSK9, включают клетку или группу клеток, которые еще не были в контакте со средством для RNAi согласно настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа контрольных клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством для RNAi.

Уровень мРНК PCSK9, 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 PCSK9 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена PCSK9. РНК можно извлекать из клеток при помощи методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и микроматричные анализы.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии PCSK9 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", используемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим PCSK9. 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 PCSK9. 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 PCSK9.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии PCSK9 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 "катыщегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, за которым следует обнаружение амплифицированных молекул при помощи методик, хорошо известных специалисту в данной области. Такие схемы обнаружения особенно пригодны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах согласно настоящему изобретению уровни экспрессии PCSK9 определяют при помощи флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™ System).

Уровни экспрессии мРНК PCSK9 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 PCSK9 также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

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

Уровень экспрессии белка PCSK9 можно определить, используя любой способ, известный в данной области для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Выражение "образец", используемое в данном документе, означает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. 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 согласно настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту так, что средство для RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии PCSK9 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня мРНК PCSK9 или белка PCSK9 в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления местом является печень. Местом также может быть подсекция или подгруппа клеток из любого из указанных выше мест. Место также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

V. Способы лечения или предупреждения ассоциированного с PCSK9 заболевания.

Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения или предупреждения заболеваний и состояний, на которые можно воздействовать путем понижающей регуляции экспрессии гена PCSK9. Например, композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения липидемии, например гиперлипидемии, и других форм нарушения баланса липидов, таких как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, и патологических состояний, ассоциированных с этими нарушениями, таких как болезни сердца и болезни, протекающие с расстройством кровообращения. Другие заболевания и состояния, на которые можно воздействовать путем понижающей регуляции экспрессии гена PCSK9, включают лизосомную болезнь накопления, в том числе, без ограничения, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Тея-Сакса, дефицит лизосомальной кислой липазы и болезнь Гоше. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества средства для RNAi согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение эффективного количества siRNA PCSK9 пациенту с гетерозиготным LDLR-генотипом.

Эффект снижения экспрессии гена PCSK9 предпочтительно приводит к снижению уровней LDLc (холестерина липопротеинов низкой плотности) в крови и, более конкретно, в сыворотке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления уровни LDLc снижаются по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с уровнями перед обработкой.

Используемое в данном документе выражение "субъект" включает человека или отличного от человека животного, предпочтительно позвоночного и более предпочтительно млекопитающего. Субъект может включать трансгенный организм. Наиболее предпочтительно, субъектом является человек, как, например, человек, страдающий от ассоциированного с PCSK9 заболевания или предрасположенный к его развитию.

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению, экспрессия PCSK9 снижается в течение длительного отрезка времени, например, по меньшей мере одной недели, двух недель, трех недель, или четырех недель, или дольше. Например, в некоторых случаях экспрессия гена PCSK9 подавляется по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% путем введения средства, представляющего собой иРНК, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ген PCSK9 подавляется по меньшей мере на примерно 60%, 70% или 80% путем введения средства, представляющего собой иРНК. В некоторых вариантах осуществления ген PCSK9 подавляется по меньшей мере примерно на 85, 90 или 95% путем введения двухцепочечного олигонуклеотида.

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

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции вещества замедленного всасывания. Инъекция вещества замедленного всасывания может высвобождать средство для RNAi 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 PCSK9, 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 введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. В определенных вариантах 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 средство для RNAi в печень.

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

Способ включает введение средства, представляющего собой иРНК, например, дозы, достаточной для понижения уровней мРНК PCSK9 в течение по меньшей мере 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней; и необязательно введение второй разовой дозы dsRNA, где вторую разовую дозу вводят по меньшей мере через 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней после введения первой разовой дозы, ингибируя, таким образом, экспрессию гена PCSK9 у субъекта.

В одном варианте осуществления дозы средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению вводят не более одного раза каждые четыре недели, не более одного раза каждые три недели, не более одного раза каждые две недели или не более одного раза каждую неделю. В другом варианте осуществления введения могут продолжаться в течение одного, двух, трех или шести месяцев, или одного года, или дольше.

В другом варианте осуществления введение может предусматриваться, когда уровни холестерина липопротеинов низкой плотности (LDLc) достигают или превосходят predetermined минимальный уровень, как, например, более 70, 130, 150, 200, 300 или 400 мг/дл.

Как правило, средство, представляющее собой иРНК, не активизирует иммунную систему, например, оно не повышает уровни цитокинов, как, например, уровни TNF-альфа или IFN-альфа. Например, при измерении при помощи анализов, таких как анализ PBMC *in vitro*, как, например, описано в данном документе, повышение уровней TNF-альфа или IFN-альфа составляет менее 30, 20 или 10% от уровня в контрольных клетках, обработанных контрольной dsRNA, такой как dsRNA, которая не нацелена на PCSK9.

Например, субъекту можно вводить терапевтическое количество средства, представляющего собой иРНК, как, например, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 или 2,5 мг/кг dsRNA. Средство, представляющее собой иРНК,

можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как, например, в течение периода 5, 10, 15, 20 или 25 мин. Введение повторяют, например, регулярно, как, например, 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 две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше. Введение средства, представляющего собой иРНК, может снижать уровни PCSK9, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% или более.

Перед введением полной дозы средства, представляющего собой иРНК, пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например, на 5% инфузионной реакции, и наблюдать их в отношении отрицательного действия, как, например, аллергических реакций или в отношении повышения уровней липидов или кровяного давления. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательного иммуностимулирующего действия, как, например, повышения уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

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 для данного средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению или состава такого средства, представляющего собой иРНК, можно также судить при помощи экспериментальной животной модели для данного заболевания, которая известна в данной области. При использовании экспериментальной животной модели, эффективность лечения доказана, если наблюдают статистически значимое снижение маркера или уменьшение симптома.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в дозе от примерно 0,25 до примерно 50 мг/кг, например, от примерно 0,25 до примерно 0,5 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 1 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 5 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 10 мг/кг, от примерно 1 до примерно 10 мг/кг, от примерно 5 до примерно 15 мг/кг, от примерно 10 до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 до примерно 25 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 до примерно 35 мг/кг или от примерно 40 до примерно 50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в дозе примерно 0,25 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 12 мг/кг, примерно 13 мг/кг, примерно 14 мг/кг, примерно 15 мг/кг, примерно 16 мг/кг, примерно 17 мг/кг, примерно 18 мг/кг, примерно 19 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 21 мг/кг, примерно 22 мг/кг, примерно 23 мг/кг, примерно 24 мг/кг, примерно 25 мг/кг, примерно 26 мг/кг, примерно 27 мг/кг, примерно 28 мг/кг, примерно 29 мг/кг, 30 мг/кг, примерно 31 мг/кг, примерно 32 мг/кг, примерно 33 мг/кг, примерно 34 мг/кг, примерно 35 мг/кг, примерно 36 мг/кг, примерно 37 мг/кг, примерно 38 мг/кг, примерно 39 мг/кг, примерно 40 мг/кг, примерно 41 мг/кг, примерно 42 мг/кг, примерно 43 мг/кг, примерно 44 мг/кг, примерно 45 мг/кг, примерно 46 мг/кг, примерно 47 мг/кг, примерно 48 мг/кг, примерно 49 мг/кг или примерно 50 мг/кг. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят в дозе примерно 25 мг/кг.

Доза средства для RNAi, которую вводят субъекту, может быть подобрана с уравниванием риска и пользы определенной дозы, например, для достижения необходимого уровня супрессии гена PCSK9 (который определяют, например, исходя из супрессии мРНК PCSK9, экспрессии белка PCSK9 или снижения уровней липидов) или необходимого терапевтического или профилактического действия, вместе с тем одновременно избегая нежелательного побочного действия.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. При необходимости облегчить проведение повторяющихся или частых инфузий, может быть целесообразным вживление устройства для доставки, например, насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутрибрюшинного, интрацестерального или внутрисуставного), или сосуда. В некоторых вариантах осуществления число или количество последовательных доз зависит от достижения необходимого действия, например, супрессии гена PCSK9, или достижения терапевтического или профилактического действия, например, уменьшения симптома гиперхолестеринемии. В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в соответствии со схемой. Например, средство для RNAi можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления схема включает введения с равными интервалами, например, каждый час, каждые четыре часа, каждые шесть часов, каждые восемь часов, каждые двенадцать часов, каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц. В других вариантах осуществления схема включает введения с небольшим интервалом с

последующим более длительным периодом времени, в течение которого средство не вводят. Например, схема может включать первоначальный набор доз, которые вводят в течение относительно короткого периода времени (например, примерно каждые 6 ч, примерно каждые 12 ч, примерно каждые 24 ч, примерно каждые 48 ч или примерно каждые 72 ч) с последующим более длительным периодом времени (например, примерно 1 неделя, примерно 2 недели, примерно 3 недели, примерно 4 недели, примерно 5 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель или примерно 8 недель), в течение которого средство для RNAi не вводят. В одном варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят каждый час, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, раз в день, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В другом варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят ежедневно, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В некоторых вариантах осуществления более длительный интервал увеличивается со временем, или его определяют, исходя из достижения необходимого действия. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят один раз в день в течение первой недели с последующим введением доз раз в неделю, начиная с восьмого дня введения. В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят через день в течение первой недели с последующим введением доз раз в неделю, начиная с восьмого дня введения.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят два раза в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят два раза в неделю в дозе 1 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят два раза в неделю в дозе 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз каждые две недели. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз каждые две недели в дозе 1 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз каждые две недели в дозе 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю в дозе 0,5 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю в дозе 1 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю в дозе 2 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят при режиме дозирования, который включает "фазу насыщения" из введений с небольшими интервалами, за которой может следовать "фаза поддержания", в которой средство для RNAi вводят с более длительными интервалами. В одном варианте осуществления фаза насыщения включает пять ежедневных введений средства для RNAi в течение первой недели. В другом варианте осуществления фаза поддержания включает введения средства для RNAi один или два раза в неделю. В дополнительном варианте осуществления фаза поддержания длится 5 недель. В одном варианте осуществления фаза насыщения включает введение дозы 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг пять раз в неделю. В другом варианте осуществления фаза поддержания включает введение дозы 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг один раз, два раза или три раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев.

Любую из этих схем необязательно можно повторять для одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения необходимого действия, например супрессии гена PCSK9, и/или достижения терапевтического или профилактического действия, например снижения уровней сывороточного холестерина или уменьшения симптома гиперхолестеринемии.

В дополнительных вариантах осуществления введение siRNA осуществляют в комбинации с дополнительным терапевтическим средством. siRNA и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в комбинации в одной и той же композиции, например парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или другим способом, описанным в данном документе.

Примеры дополнительных терапевтических средств включают средства, известные для лечения нарушений липидного обмена, таких как гиперхолестеринемия, атеросклероз или дислипидемия. Например, siRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить, например, с ингибитором редуцтазы HMG-CoA (например, статином), фибратом, секвестрантом желчных кислот, ниацином, антитромбоцитарным средством, ингибитором ангиотензинпревращающего фермента, антагонистом рецепторов ангиотензина II (например, лозартаном калия, как, например, Cozaar® от Merck & Co.), ингибитором ацил-CoA:холестерин-ацилтрансферазы (ACAT), ингибитором абсорбции холестерина, ингибитором транспортного белка эфиров холестерина (CEPT), ингибитором микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTTP), модулятором холестерина, модулятором желчной кислоты, агонистом рецептора, активированного пролифератором пероксисом (PPAR), средством для генной терапии, комплексным защитным веществом для сосудов (например, AGI-1067 от Atherogenics), ингибитором гликопротеина IIb/IIIa, аспирином или аспирино-подобным веществом, ингибитором IBAT (например, S-8921 от Shionogi), ингиби-

тором синтеза сквалена или ингибитором моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-I. Иллюстративные ингибиторы редуктазы HMG-CoA включают аторвастатин (Lipitor®/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl от Pfizer), правастатин (Pravachol от Bristol-Myers Squibb, Mevalotin/Sanaprav от Sankyo), симвастатин (Zocor®/Sinvacor от Merck, Denan от Boehringer Ingelheim, Lipovas от Banyu), ловастатин (Mevacor/Mevinacor от Merck, Lovastatina от Bexal, Liposcler от Cepa Schwarz Pharma), флувастатин (Lescol®/Locol/Lochol от Novartis, Cranoc от Fujisawa, Digaril от Solvay), церивастатин (Lipobay/Glaxo от Bayer, Baycol от SmithKline), розувастатин (Crestor® от AstraZeneca) и питивастатин (итавастатин/ризивастатин) (Nissan Chemical, Kowa Kogyo, Sankyo и Novartis). Иллюстративные фибраты включают, например, безафибрат (например, Befizal®/Cedur®/Bezalip® от Roche, Bezatol от Kissei), клофибрат (например, Atromid-S® от Wyeth), фенофибрат (например, Lipidil/Lipantil от Fournier, Tricor® от Abbott, Lipantil от Takeda, дженерики), гемфиброзил (например, Lopid/Lipur от Pfizer) и ципрофибрат (Modalim® от Sanofi-Synthelabo). Иллюстративные секвестранты желчных кислот включают, например, холестирамин (Questran® и Questran Light™ от Bristol-Myers Squibb), колестипол (например, Colestid от Pharmacia) и колесевелам (WelChol™ от Genzyme/Sankyo). Иллюстративные средства для терапии с ниацином включают, например, составы с быстрым высвобождением, такие как Nicobid от Aventis, Niacor от Upsher-Smith, Nicolar от Aventis и Percycit от Sanwakagaku. Составы замедленного высвобождения с ниацином включают, например, Niaspan от Kos Pharmaceuticals и Slo-Niacin от Upsher-Smith. Иллюстративные антитромбоцитарные средства включают, например, аспирин (например, аспирин от Bayer), клопидогрель (Plavix от Sanofi-Synthelabo/Bristol-Myers Squibb) и тиклопидин (например, Ticlid от Sanofi-Synthelabo и Panaldine от Daiichi). Другие аспирин-подобные соединения пригодные в комбинации с dsRNA, нацеленными на PCSK9, включают, например, Asacard (медленно высвобождающийся аспирин от Pharmacia) и памикогрель (Kanebo/Angelini Ricerche/CEPA). Иллюстративные ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента включают, например, рамиприл (например, Altace от Aventis) и эналаприл (например, Vasotec от Merck & Co.). Иллюстративные ингибиторы ацилCoA:холестерин-ацилтрансферазы (ACAT) включают, например, авазимиб (Pfizer), эфлюцимиб (BioMsrieux Pierre Fabre/Eli Lilly), CS-505 (Sankyo и Kyoto) и SMP-797 (Sumito). Иллюстративные ингибиторы абсорбции холестерина включают, например, эзетимиб (Zetia® от Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) и Pamaqueside (Pfizer). Иллюстративные ингибиторы CETP включают, например, торцетрапиб (также называемый CP-529414 от Pfizer), JTT-705 (Japan Tobacco) и CETi-I (Avant Immunotherapeutics). Иллюстративные ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP) включают, например, имплитапид (Bayer), R-103757 (Janssen) и CP-346086 (Pfizer). Другие иллюстративные модуляторы холестерина включают, например, N0-1886 (Otsuka/TAP Pharmaceutical), CI-1027 (Pfizer) и WAY-135433 (Wyeth-Ayerst).

Иллюстративные модуляторы желчной кислоты включают, например, HBS-107 (Hisamitsu/Banyu), Btg-511 (British Technology Group), BARI-1453 (Aventis), S-8921 (Shionogi), SD-5613 (Pfizer) и AZD-7806 (AstraZeneca). Иллюстративные агонисты рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, (PPAR) включают, например, тезаглитазар (AZ-242) (AstraZeneca), нетоглитазон (MCC-555) (Mitsubishi/Johnson & Johnson), GW-409544 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), GW-501516 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), LY-929 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly), LY-465608 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly), LY-518674 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly) и МК-767 (Merck и Kyorin). Иллюстративные средства для разновидностей генной терапии включают, например, AdGWEGF 121.10 (GenVec), ApoA1 (UCB Pharma/Groupe Fournier), EG-004 (Trinam) (Ark Therapeutics) и АТФ-связывающая кассета-транспортер-А1 (ABCA1) (CV Therapeutics/Incyte, Aventis, Xenon). Иллюстративные ингибиторы гликопротеина IIb/IIIa включают, например, роксифибан (также называемый DMP754, Bristol-Myers Squibb), гантофибан (Merck KGaA/Yamanouchi) и кромафибан (Millennium Pharmaceuticals). Иллюстративные ингибиторы синтеза сквалена включают, например, BMS-1884941 (Bristol-Myers Squibb), CP-210172 (Pfizer), CP-295697 (Pfizer), CP-294838 (Pfizer) и ТАК-475 (Takeda). Иллюстративным ингибитором MCP-I является, например, RS-504393 (Roche Bioscience). Противоатеросклеротическое средство BO-653 (Chugai Pharmaceuticals) и производное никотиновой кислоты Nyclin (Yamanouchi Pharmaceuticals) также подходят для введения в комбинации с dsRNA, описанной в настоящем изобретении. Иллюстративные средства комбинированной терапии, подходящие для введения с dsRNA, нацеленными на PCSK9, включают, например, адвикор (ниацин/ловастатин от Kos Pharmaceuticals), амлодипин/аторвастатин (Pfizer) и эзетимиб/симвастатин (например, таблетки Vytorin® с дозировкой 10/10, 10/20, 10/40 и 10/80, Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals). Средства для лечения гиперхолестеринемии, и подходящие для введения в комбинации с dsRNA, нацеленными на PCSK9, включают, например, ловастатин, ниацин, таблетку с пролонгированным действием Altoprev® (Andrx Labs), ловастатин, таблетки Caduet® (Pfizer), амлодипин безилат, аторвастатин в форме кальциевой соли, таблетки Crestor® (AstraZeneca), розувастатин в форме кальциевой соли, капсулы Lescol® (Novartis), флувастатин в форме натриевой соли Lescol® (Reliant, Novartis), флувастатин в форме натриевой соли, таблетки Lipitor® (Parke-Davis), аторвастатин в форме кальциевой соли, капсулы Lofibra® (Gate), таблетки с пролонгированным действием Ниаспан (Kos), ниацин, таблетки Pravachol (Bristol-Myers Squibb), правастатин в форме натриевой соли, таблетки TriCor® (Abbott), фенофибрат, таблетки Vytorin® с дозировкой 10/10 (Merck/Schering-Plough Pharmaceu-

ticals), эзетимиб, симвастатин, таблетки WelChol™ (Sankyo), колесевелам в форме хлористоводородной соли, таблетки Zetia® (Schering), эзетимиб, таблетки Zetia® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) и эзетимиб, таблетки Zocor® (Merck).

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят в комбинации с комбинацией эзетимиба/симвастатина (например, Vytorin® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals)). В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят пациенту и затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или vice versa). В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

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

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения пациента путем отбора пациента при условии, что пациент нуждается в снижении уровня LDL, снижении уровня LDL без снижения уровня HDL, снижении уровня ApoB или снижении уровня общего холестерина. Способ включает введение пациенту siRNA в количестве, достаточном для снижения уровней LDL или уровней ApoB у пациента, например, без снижения в значительной степени уровней HDL.

Генетическая предрасположенность играет роль в развитии ассоциированных с целевым геном заболеваний, например, гиперлипидемии. Таким образом, пациента, нуждающегося в siRNA, можно выявить путем анализа семейного анамнеза или, например, тестирования на наличие одного или нескольких генетических маркеров или вариантов. Примеры генов, вовлеченных в гиперлипидемию, включают, без ограничения, например, таковые рецептора LDL (LDLR), аполипротеинов (ApoA1, ApoB, ApoE и т.п.), транспортного белка эфиров холестерина (CEMP), липопротеинлипазы (LPL), печеночной липазы (LIPC), эндотелиальной липазы (EL), лецитин:холестерин ацилтрансферазы (LCAT).

Медицинский работник, такой как врач, медицинская сестра, или член семьи могут принять во внимание семейный анамнез перед назначением или введением средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению. Кроме того, можно выполнить анализ для определения генотипа или фенотипа. Например, можно выполнить ДНК-анализ с образцом от пациента, например образцом крови, для установления PCSK9-генотипа и/или -фенотипа перед введением пациенту dsRNA к PCSK9. В другом варианте осуществления выполняют анализ для установления родственного генотипа и/или фенотипа, например, LDLR-генотипа. Примеры генетических вариантов гена LDLR можно найти в уровне техники, например, в следующих публикациях, которые включены при помощи ссылки: Costanza et al (2005) *Am J Epidemiol.* 15;161(8):714-24; Yamada et al. (2008) *J Med Genet.* Jan; 45(1):22-8, электронная публикация 31 августа 2007 г.; и Boes et al (2009) *Exp. Gerontol* 44: 136-160, электронная публикация 17 ноября 2008 г.

VI. Наборы.

Настоящее изобретение также предусматривает наборы для применения любого из средств, представляющих собой иРНК, и/или осуществления любого из способов согласно настоящему изобретению. Такие наборы включают одно или несколько средств для RNAi и инструкции по применению, например, инструкции для ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке путем приведения клетки в контакт со средством(ами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии PCSK9. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для приведения клетки в контакт со средством для RNAi (например, устройство для инъекции) или средства для определения степени ингибирования PCSK9 (например, средства для определения степени ингибирования мРНК PCSK9 или белка TTR). Такие средства для определения степени ингибирования PCSK9 могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец плазмы. Наборы согласно настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для введения средства(средств) для RNAi субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или 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

Материалы и способы.

Следующие материалы и способы использовали в примерах.

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.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Hep3В, HepG2 или HeLa (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в рекомендованной среде (ATCC), дополненной 10% FBS и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Для дуплексов, отсортированных в 96-луночном формате, трансфекцию выполняли путем добавления 44,75 мкл Opti-MEM с 0,25 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пятьдесят мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~2×10⁴ клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Для дуплексов, отсортированных в 384-луночном формате, 5 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) смешивали с 5 мкл каждого дуплекса siRNA на отдельную лунку. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин с последующим добавлением 40 мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~8×10³ клеток. 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 и эксперименты в отношении эффекта дозы выполняли с использованием 8 X 5-кратных серийных разведений, начиная с 2 нМ.

Трансфекция посредством свободного поглощения.

Пять мкл каждой конъюгированной с GalNac siRNA в PBS объединяли с 3×10⁴ свежеразмороженных криосохраненных гепатоцитов макаков-крабоедов (In Vitro Technologies-Celsis, Балтимор, Мэриленд; серийный номер JQD), ресуспендированных в 95 мкл сред "In Vitro Gro CP media" (In Vitro Technologies-Celsis, Балтимор, Мэриленд), в каждой лунке 96-луночного планшета или 5 мкл siRNA и 45 мкл сред, содержащих 1,2×10³ клеток, для формата 384-луночного планшета. Смеси инкубировали в течение примерно 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. siRNA тестировали при множестве концентраций от 500 до 0,1 нМ для экспериментов в отношении разовой дозы и с использованием 8 X 5-кратных серийных разведений, начиная с 500 нМ, для экспериментов в отношении эффекта дозы.

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

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем смешивали в течение 5 мин при 850 об./мин с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и смешивали в течение 1 мин. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин. Удаляли пятьдесят мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Для 384-луночного формата клетки лизировали в течение одной минуты путем добавления 50 мкл лизирующего/связывающего буфера. Применяли два мкл магнитных гранул на лунку. Необходимый объем гранул делили на аликвоты, фиксировали на магнитном стенде и удаляли раствор для хранения гранул. Гранулы затем ресуспендировали в необходимом объеме лизирующего/связывающего буфера (25 мкл на лунку) и 25 мкл суспензии с гранулами добавляли к лизированным клеткам. Смесь лизата и гранул инкубировали в течение 10 мин на VibraTransaltor при параметре №7 (UnionScientific Corp., Рэндоллстаун, Мэриленд). Впоследствии гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда, супернатант удаляли и гранулы промывали один раз 90 мкл буфера А с последующими отдельными стадиями промывания 90 мкл буфера В и 100 мкл элюирующего буфера. Гранулы пропитывали каждым промывочным буфером в течение ~1 мин (без использования смешивания). После конечной стадии промывания гранулы ресуспендировали в 15 мкл элюирующего буфера в течение 5 мин при 70°C с последующим фиксированием гранул и удалением супернатанта (до 8 мкл) для синтеза кДНК и/или хранения очищенной РНК (-

20°C).

PCR в режиме реального времени.

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для PCSK9 человека (Applied Biosystems, № по кат. Hs03037355_m1) для клеток человека или 0,5 мкл набора реагентов "Custom TaqMan Assay" для GAPDH яванского макака (150 нМ супо GAP F праймер-5'GCATCCTGGGCTACACTGA (SEQ ID NO: 5); 150 нМ супо GAP R праймер-5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO: 6) 250 нМ супо GAP зонд-5'-5HEX-CCAGGTGGTCTCCTCC-BHQ1-Q-3' (SEQ ID NO: 7)), 0,5 мкл набора реагентов "Custom TaqMan Assay" для PCSK9 яванского макака (900 нМ супо PCSK9 F праймер 5'-ACGTGGCTGGCATTGCA (SEQ ID NO: 8); 900 нМ супо PCSK9 R праймер 5'-AAGTGGATCAGTCTCTGCCTCAA (SEQ ID NO: 9); 250 нМ супо PCSK9 зонд 5'-6FAM-CATGATGCTGTCTGCCGAGCCG-BHQ1-Q-3' (SEQ ID NO: 10)) для клеток яванского макака, и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением ΔΔCt(RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали при двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях, если не указано иное.

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением ΔΔCt-способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками. Для анализов со свободным поглощением данные нормализовали в соответствии с таковыми по обработанным PBS или GalNAc-1955 (самая высокая концентрация для экспериментальных соединений) клеткам. IC₅₀ 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 антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой: смысловая: 5'-сuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 11) и антисмысловая: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 12).

Таблица В

Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат

Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
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'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-дезоксуридин
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипропиол-Нур-(GalNAc-алкил)3
(Aeo)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат

(Aeos)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(A3m)	3'-О-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-О-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-О-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-О-метилуридин-2'-фосфат
(U3mx)	3'-О-метилксилоуридин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(pshe)	гидроксиэтилфосфотиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат
(Tgn)	тимидин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
(Cgn)	цитидин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Ggn)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Agn)	аденозин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA)
P	5'-фосфат
(m5Cam)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(Tam)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфотиоат
(Aam)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфотиоат
(Gam)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфотиоат
(Uyh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-уридин-3'-фосфат
(Ayh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-аденозин-3'-фосфат
(Gyh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-гуанозин-3'-фосфат
(Cyh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-цитидин-3'-фосфат

Пример 1. Синтез конъюгированных с GalNAc олигонуклеотидов.

Серии дуплексов siRNA, охватывающих последовательность мРНК PCSK9, конструировали, синтезировали и конъюгировали с трехвалентным GalNAc на 3-конце смысловой нити, применяя методики, описанные выше. Последовательности таких дуплексов показаны в табл. 1. Такие же последовательности также синтезировали с различными нуклеотидными модификациями и конъюгировали с трехвалентным GalNAc. Последовательности модифицированных дуплексов показаны в табл. 2.

Немодифицированные последовательности для PCSK9

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая транс. посл.	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая транс. посл.	SEQ ID NO:	Начал о в NM_174936.3	Конец в NM_174936.3
AD-53649.1	A-110542.1	CGAGGACGGCGACUACGAGGA	13	A-109239.2	UCCUCGUAGUCGCCGUCCUGUC	234	459	481
AD-53661.1	A-110544.1	ACCGCUCGCGCAAGGAUCCGU	14	A-109243.2	ACGGAUCCUUGGCGCAGCGGUGG	235	554	576
AD-53667.1	A-110545.1	GCU GCGCAAGGAUCCGUGGA	15	A-109245.2	UCCACGGAUCCUUGGCGCAGCGG	236	557	579
AD-53679.1	A-110547.1	CUACGUGGUGGUGCUGAAGGA	16	A-109249.2	UCCUUCAGCACACCACGUAGGU	237	591	613
AD-53685.1	A-110548.1	CCCCCGGGGAUACCUACCA	17	A-109251.2	UGGUGAGGUAUCCCCGGCGGCA	238	668	690
AD-53691.1	A-110549.1	CCGCCGGGAUACCUACCAA	18	A-109253.2	UUGGUGAGGUAUCCCCGGCGGCG	239	669	691
AD-53650.1	A-110550.1	GCCGGGAUACCUACCAAGA	19	A-109255.2	UCUUGGUGAGGUAUCCCCGGCGG	240	671	693
AD-53656.1	A-110551.1	CCGGGAUACCUACCAAGAU	20	A-109257.2	AUCUUGGUGAGGUAUCCCCGGCGG	241	672	694
AD-53668.1	A-110553.1	AUACCUACCAAGAUCCUGCA	21	A-109261.2	UGCAGGAUCUUGGUGAGGUAUCC	242	678	700
AD-53674.1	A-110554.1	CACCAAGAUCCUGCAUGUCUU	22	A-109263.2	AAGACAUGCAGGAUCUUGGUGAG	243	684	706
AD-53680.1	A-110555.1	CAAGAUCCUGCAUGUCUCCA	23	A-109265.2	UGGAAGACAUGCAGGAUCUUGGU	244	687	709
AD-53692.1	A-110557.1	GUUGCCCCAUGUCGACUACAU	24	A-109269.2	AUGUAGUCGACAUGGGGCAACUU	245	768	790
AD-53651.1	A-110558.1	GCCCCAUGUCGACUACAU CGA	25	A-109271.2	UCGAUGUAGUCGACAUGGGGCAA	246	771	793
AD-53657.1	A-110559.1	CCAUGUCGACUACAU CGAGGA	26	A-109273.2	UCCUCGAUGUAGUCGACAUGGGG	247	774	796
AD-53663.1	A-110560.1	UCGACUACAU CGAGGAGGACU	27	A-109275.2	AGUCCUCCUGGAUGUAGUCGACA	248	779	801
AD-53669.1	A-110561.1	ACUACAU CGAGGAGGACUCCU	28	A-109277.2	AGGAGUCCUCCUGGAUGUAGUCG	249	782	804
AD-53675.1	A-110562.1	UACAU CGAGGAGGACUCCUCU	29	A-109279.2	AGAGGAGUCCUCCUGGAUGUAGU	250	784	806
AD-53681.1	A-110563.1	UCGAGGAGGACUCCUCUGUCU	30	A-109281.2	AGACAGAGGAGUCCUCCUGAU	251	788	810
AD-53687.1	A-110564.1	CGAGGAGGACUCCUCUGUCUU	31	A-109283.2	AAGACAGAGGAGUCCUCCUGAU	252	789	811
AD-53693.1	A-110565.1	GUACCGGGGGAUGAAUACCA	32	A-109285.2	UGGUAUUCAUCCGCCGGUACCG	253	855	877
AD-53652.1	A-110566.1	CCUGGUGGAGGUGUAUCUCCU	33	A-109287.2	AGGAGAUACACCUCCACCAGGCU	254	894	916
AD-53658.1	A-110567.1	CUGGUGGAGGUGUAUCUCCUA	34	A-109289.2	UAGGAGAUACACCUCCACCAGGC	255	895	917
AD-53664.1	A-110568.1	GGUGGAGGUGUAUCUCCUAGA	35	A-109291.2	UCUAGGAGAUACACCUCCACCAG	256	897	919
AD-53670.1	A-110569.1	UGGAGGUGUAUCUCCUAGACA	36	A-109293.2	UGUCUAGGAGAUACACCUCCACC	257	899	921
AD-53676.1	A-110570.1	AGGUGUAUCUCCUAGACACCA	37	A-109295.2	UGGUGUCUAGGAGAUACACCUCC	258	902	924
AD-53682.1	A-110571.1	GUAUCUCCUAGACACCAGCAU	38	A-109297.2	AUGCUGGUGUCUAGGAGAUACAC	259	906	928
AD-53688.1	A-110572.1	UAUCUCCUAGACACCAGCAUA	39	A-109299.2	UAUGCUGGUGUCUAGGAGAUACA	260	907	929
AD-53694.1	A-110573.1	UCUCCUAGACACCAGCAUACA	40	A-109301.2	UGUAUGCUGGUGUCUAGGAGAU	261	909	931
AD-53653.1	A-110574.1	UCCUAGACACCAGCAUACAGA	41	A-109303.2	UCUGUAUGCUGGUGUCUAGGAGA	262	911	933
AD-53659.1	A-110575.1	AGACACCAGCAUACAGAGUGA	42	A-109305.2	UCACUCUGUAUGCUGGUGUCUAG	263	915	937
AD-53665.1	A-110576.1	CACCAGCAUACAGAGUGACCA	43	A-109307.2	UGGUCACUCUGUAUGCUGGUGUC	264	918	940
AD-53671.1	A-110577.1	UACAGAGUACACCACGGGAAA	44	A-109309.2	UUUCCCGGUGGUCACUCUGUAUG	265	926	948
AD-53677.1	A-110578.1	ACAGAGUGACCACGGGAAAU	45	A-109311.2	AUUUCCCGGUGGUCACUCUGUAU	266	927	949
AD-53683.1	A-110579.1	GAGUGACCACGGGAAAU CGA	46	A-109313.2	UCGAUUUCCCGGUGGUCACUCUG	267	930	952
AD-53689.1	A-110580.1	GGAAAU CGAGGGCAGGGUCAU	47	A-109315.2	AUGACCCUGCCUCCGAUUUCCCG	268	942	964
AD-53695.1	A-110581.1	AAUCGAGGGCAGGGUCAUGGU	48	A-109317.2	ACCAUGACCCUGCCUCCGAUUUCC	269	945	967
AD-53654.1	A-110582.1	GCAGGGUCAUGGUCACCGACU	49	A-109319.2	AGUCGGUGACCAUGACCCUGCCC	270	953	975
AD-53660.1	A-110583.1	CAGGGUCAUGGUCACCGACUU	50	A-109321.2	AAGUCGGUGACCAUGACCCUGCC	271	954	976
AD-53666.1	A-110584.1	GGUCAUGGUCACCGACUUCGA	51	A-109323.2	UCGAAGUCGGUGACCAUGACCCU	272	957	979
AD-53672.1	A-110585.1	UCAUGGUCACCGACUUCGAGA	52	A-109325.2	UCUCGAAGUCGGUGACCAUGACC	273	959	981
AD-53678.1	A-110586.1	AGGACGGGACCCGCUUCCACA	53	A-109327.2	UGUGGAAGCGGGUCCCGUCCUCC	274	992	1014
AD-53684.1	A-110587.1	CGGGACCCGCUUCCACAGACA	54	A-109329.2	UGUCUGUGGAAGCGGGUCCCGUC	275	996	1018
AD-53690.1	A-110588.1	UCCACAGACAGGCCAGCAAGU	55	A-109331.2	ACUUGCUGGCCUGUCUGUGGAAG	276	1007	1029
AD-53696.1	A-110589.1	CCU GCGGUCUCAACUGCCA	56	A-109333.2	UGGCAGUUGAGCACGCGCAGGCU	277	1107	1129
AD-53702.1	A-110590.1	CUGCGGUCUCAACUGCCA	57	A-109335.2	UUGGCAGUUGAGCACGCGCAGGC	278	1108	1130
AD-53708.1	A-110591.1	CGUGCUCAACUGCCAAGGGAA	58	A-109337.2	UUCUCCUUGGCAGUUGAGCACGCGG	279	1113	1135
AD-53714.1	A-110592.1	CACCCUCAUAGGCCUGGAGUU	59	A-109339.2	AAUCCAGGCCUAUGAGGGUGCC	280	1149	1171
AD-53720.1	A-110593.1	ACCCUCAUAGGCCUGGAGUUU	60	A-109341.2	AAAUCCAGGCCUAUGAGGGUGC	281	1150	1172
AD-53726.1	A-110594.1	CCCUCAUAGGCCUGGAGUUUA	61	A-109343.2	UAAAUCCAGGCCUAUGAGGGUG	282	1151	1173

046901

AD-53732.1	A-110595.1	CCUCAUAGGCCUGGAGUUUUAU	62	A-109345.2	AUAAACUCCAGGCCUAUGAGGGU	283	1152	1174
AD-53738.1	A-110596.1	CUCAUAGGCCUGGAGUUUUAU	63	A-109347.2	AAUAAACUCCAGGCCUAUGAGGG	284	1153	1175
AD-53697.1	A-110597.1	UAGGCCUGGAGUUUUAUCGGA	64	A-109349.2	UCCGAAUAAACUCCAGGCCUAUG	285	1157	1179
AD-53703.1	A-110598.1	AGGCCUGGAGUUUUAUCGGAA	65	A-109351.2	UUCGAAUAAACUCCAGGCCUAU	286	1158	1180
AD-53709.1	A-110599.1	GGCCUGGAGUUUUAUCGAAA	66	A-109353.2	UUUCCGAAUAAACUCCAGGCCUA	287	1159	1181
AD-53715.1	A-110600.1	GCCUGGAGUUUUAUCGAAAA	67	A-109355.2	UUUCCGAAUAAACUCCAGGCCU	288	1160	1182
AD-53721.1	A-110601.1	GGAGUUUUAUCGAAAAAGCCA	68	A-109357.2	UUGCCUUUUCGAAUAAACUCCAG	289	1164	1186
AD-53727.1	A-110602.1	GUUUUAUCGAAAAAGCCAGCU	69	A-109359.2	AGCUGGCCUUUCCGAAUAAACUC	290	1167	1189
AD-53733.1	A-110603.1	GGGUCGGGUCGUGCGUGGUA	70	A-109361.2	UGACCAGCACGACCCAGCCUC	291	1277	1299
AD-53739.1	A-110604.1	GGUCACCGCUGCCGCAACU	71	A-109363.2	AAGUUGCCGCGAGCGUGACCAG	292	1293	1315
AD-53698.1	A-110605.1	GGGACGAUGCCUGCCUCUACU	72	A-109365.2	AGUAGAGGCGAGCAUCGUCCCG	293	1316	1338
AD-53704.1	A-110606.1	CAACUUUGCCCGCUGUGUGGA	73	A-109367.2	UCCACACAGCGGCAAGUUGGU	294	1419	1441
AD-53710.1	A-110607.1	UUGCCCGCUGUGGACCUCU	74	A-109369.2	AGAGGUCCACACAGCGGCAAA	295	1424	1446
AD-53716.1	A-110608.1	UGGCCGUCUGUGGACCUCUU	75	A-109371.2	AAGAGGUCCACACAGCGGCAAA	296	1425	1447
AD-53722.1	A-110609.1	GGCCGUCUGUGGACCUCUUU	76	A-109373.2	AAAGAGGUCCACACAGCGGCAA	297	1426	1448
AD-53728.1	A-110610.1	UGUGUGGACCUCUUUGCCCA	77	A-109375.2	UGGGGCAAGAGGUCCACACAGC	298	1432	1454
AD-53734.1	A-110611.1	GGGAGGACAUCAUUGUGGCU	78	A-109377.2	AGGCACCAUUGAUUGUCCUCCU	299	1454	1476
AD-53740.1	A-110612.1	ACUGCAGCACCCUGCUUGUGU	79	A-109379.2	ACACAAAGCAGGUGCUGCAGUCG	300	1481	1503
AD-53699.1	A-110613.1	GCAUUGCAGCCAUGAUGCUGU	80	A-109381.2	ACAGCAUCAUGGUGCAUUGCCA	301	1541	1563
AD-53705.1	A-110614.1	GUUGAGGCGAGACUGAUCCA	81	A-109383.2	UGGAUCAGUCUCUGCCUACUC	302	1590	1612
AD-53711.1	A-110615.1	UGAGGCGAGACUGAUCCACU	82	A-109385.2	AGUGGAUCAGUCUCUGCCUAC	303	1592	1614
AD-53717.1	A-110616.1	GAGGCGAGACUGAUCCACUU	83	A-109387.2	AAGUGGAUCAGUCUCUGCCUAA	304	1593	1615
AD-53723.1	A-110617.1	GGCAGAGACUGAUCCACUUU	84	A-109389.2	AGAAGUGGAUCAGUCUCUGCCU	305	1595	1617
AD-53729.1	A-110618.1	CAGAGACUGAUCCACUUUCU	85	A-109391.2	AGAGAAGUGGAUCAGUCUCUGCC	306	1597	1619
AD-53735.1	A-110619.1	ACUGAUCCACUUUCUGCCAA	86	A-109393.2	UUGGCGAGAAGUGGAUCAGUCU	307	1602	1624
AD-53741.1	A-110620.1	AUCCACUUUCUGCCAAAGAU	87	A-109395.2	AUCUUUGGCGAGAAGUGGAUCA	308	1606	1628
AD-53700.1	A-110621.1	GGCCUGGUUCCUGAGGACCA	88	A-109397.2	UGGUCCUAGGGAACAGGCCUC	309	1638	1660
AD-53706.1	A-110622.1	GGUACUGACCCCAACCUUGU	89	A-109399.2	ACCAGGUUGGGGUCAGUACCCG	310	1662	1684
AD-53712.1	A-110623.1	GUUGGCGAGCUGUUUGCAGGA	90	A-109401.2	UCCUGCAAAACAGCUGCCAAU	311	1715	1737
AD-53718.1	A-110624.1	UGGCGAGCUGUUUGCAGGACU	91	A-109403.2	AGUCCUGCAAACAGCUGCCAAC	312	1717	1739
AD-53724.1	A-110625.1	GCAGCUGUUUGCAGGACUGU	92	A-109405.2	ACAGUCCUGCAAACAGCUGCCA	313	1719	1741
AD-53730.1	A-110626.1	UCUGCCGGGCCACAACGCUU	93	A-109407.2	AAGCGUUGUGGGCCGCGAGACC	314	1883	1905
AD-53736.1	A-110627.1	CUGCCGGGCCACAACGCUUU	94	A-109409.2	AAAGCGUUGUGGGCCGCGAGAC	315	1884	1906
AD-53742.1	A-110628.1	GCCCAACGCUUUUGGGGGU	95	A-109411.2	ACCCCAAAAGCGUUGUGGGCCC	316	1891	1913
AD-53701.1	A-110629.1	CGCUUUUGGGGGUGAGGGUGU	96	A-109413.2	ACACCCUACCCCAAAAGCGUU	317	1899	1921
AD-53707.1	A-110630.1	CUUUUGGGGGUGAGGGUGUCU	97	A-109415.2	AGACACCCUACCCCAAAAGCG	318	1901	1923
AD-53713.1	A-110631.1	UUUUUGGGGGUGAGGGUGUCU	98	A-109417.2	UAGACACCCUACCCCAAAAGC	319	1902	1924
AD-53719.1	A-110632.1	GGGGUGAGGGUGUCUACGCCA	99	A-109419.2	UGGCGUAGACACCCUACCCCA	320	1907	1929
AD-53725.1	A-110633.1	GGGUGAGGGUGUCUACGCCAU	100	A-109421.2	AUGGCGUAGACACCCUACCCCC	321	1908	1930
AD-53731.1	A-110634.1	GGUGAGGGUGUCUACGCCAUU	101	A-109423.2	AAUGGCGUAGACACCCUACCCCC	322	1909	1931
AD-53737.1	A-110635.1	AGGGUGUCUACGCCAUUGCCA	102	A-109425.2	UGGCAUUGGCGUAGACACCCUCA	323	1913	1935
AD-53743.1	A-110636.1	GUGUCUACGCCAUUGCCAGGU	103	A-109427.2	ACCUGGCAAUGGCGUAGACACCC	324	1916	1938
AD-53749.1	A-110637.1	UGCAGCGUCCACACAGCUCCA	104	A-109429.2	UGGAGCUGUGGGAGCGUGCAGU	325	1960	1982
AD-53755.1	A-110638.1	GCAUGGGGACCCGUGUCCACU	105	A-109431.2	AGUGGACCGGGUCCCAUGCUG	326	1994	2016
AD-53761.1	A-110639.1	CCCACAAGCCCGCUGUGCUGA	106	A-109433.2	UCAGCACAGGCGGCUUGGGGUG	327	2078	2100
AD-53767.1	A-110640.1	GAGGCCACGAGGUCAGCCCAA	107	A-109435.2	UUGGGCUGACCUCGUGGCCUCAG	328	2097	2119
AD-53773.1	A-110641.1	CACGAGGUCAGCCCAACCAGU	108	A-109437.2	ACUGGUUGGGCUGACCCUGGCG	329	2102	2124
AD-53779.1	A-110642.1	GGGAGGCCAGCAUCCACGCUU	109	A-109439.2	AAGCGUGGAUGCUGGCCUCCUG	330	2135	2157
AD-53785.1	A-110643.1	AUCCACGCUUCCUGCUGCCA	110	A-109441.2	AUGGCGAGGAAGCGUGGAUGC	331	2146	2168
AD-53744.1	A-110644.1	GGAUUGCAAAGUCAAGGAGCA	111	A-109443.2	UGCUCUUUGACUUUGCAUUCAG	332	2178	2200
AD-53750.1	A-110645.1	AAUCCGGCCCUACAGGAGCA	112	A-109445.2	UGCUCUUGAGGGGCGGGAUUC	333	2202	2224
AD-53762.1	A-110647.1	GCUGGGGCUGAGCUUUAAAAU	113	A-109449.2	AUUUUAAAGCUCAGCCCAAGCC	334	2479	2501

046901

AD-53768.1	A-110648.1	GGAGGUGCCAGGAAGCUCCCU	114	A-109451.2	AGGGAGCUUCCUGGCACCUCCAC	335	2648	2670
AD-53774.1	A-110649.1	ACUGUGGGGCAUUUCCCAUU	115	A-109453.2	AAUGGUGAAUUGCCACACUGA	336	2674	2696
AD-53780.1	A-110650.1	CCACCAAGGAGGCAGGAUUUCU	116	A-109455.2	AGAAUCCUGCCUCCUUGGUGGAG	337	2811	2833
AD-53786.1	A-110651.1	CACCAAGGAGGCAGGAUUUCU	117	A-109457.2	AAGAAUCCUGCCUCCUUGGUGGA	338	2812	2834
AD-53804.1	A-110701.1	ACCAAGGAGGCAGGAUUUCUU	118	A-109557.2	AAAGAAUCCUGCCUCCUUGGUGG	339	2813	2835
AD-53810.1	A-110702.1	GGAGGCAGGAUUUCCCAUU	119	A-109559.2	AAUGGGAAGAAUCCUGCCUCCU	340	2818	2840
AD-53816.1	A-110703.1	GAGGCAGGAUUUCCCAUGA	120	A-109561.2	UCAUGGGAAGAAUCCUGCCUCCU	341	2819	2841
AD-53745.1	A-110652.1	UGAUGGCCUCAUCUCCAGCU	121	A-109459.2	AGCUGGAGAUAGGGCCAUCAGC	342	2904	2926
AD-53822.1	A-110704.1	CUUUCUGGAUGGCAUCUAGCA	122	A-109563.2	UGCUAGAUGCCAUCAGAAAGCU	343	2971	2993
AD-53751.1	A-110653.1	UUUCUGGAUGGCAUCUAGCCA	123	A-109461.2	UGGCUAGAUGCCAUCAGAAAGC	344	2972	2994
AD-53827.1	A-110705.1	UUCUGGAUGGCAUCUAGCCAA	124	A-109565.2	UUGGCUAGAUGCCAUCAGAAAG	345	2973	2995
AD-53757.1	A-110654.1	UCUGGAUGGCAUCUAGCCAGA	125	A-109463.2	UCUGGCUAGAUGCCAUCAGAAA	346	2974	2996
AD-53833.1	A-110706.1	CUGGAUGGCAUCUAGCCAGAA	126	A-109567.2	UUCUGGCUAGAUGCCAUCAGAA	347	2975	2997
AD-53793.1	A-110707.1	CUUUCUCUGCUUAUGCCAA	127	A-109569.2	UUGGCAUAGAGCAGUAAAGGU	348	3053	3075
AD-53799.1	A-110708.1	UUUACUCUGCUUAUGCCAGA	128	A-109571.2	UCUGGCAUAGAGCAGUAAAGG	349	3054	3076
AD-53763.1	A-110655.1	GCUCUAUGCCAGGCUUGGCUA	129	A-109465.2	UAGCACGCCUGGCAUAGAGCAG	350	3062	3084
AD-53769.1	A-110656.1	CUCAGCCAACCCGCUCCACUA	130	A-109467.2	UAGUGGAGCGGUUGGCUAGAGAC	351	3158	3180
AD-53805.1	A-110709.1	UCAGCCAACCCGCUCCACUA	131	A-109573.2	UUAGUGGAGCGGUUGGCUAGAGA	352	3159	3181
AD-53811.1	A-110710.1	CCUGCCAAGCUCACACAGCAA	132	A-109575.2	UUGCUGUGUGAGCUUGGCAGGCA	353	3245	3267
AD-53781.1	A-110658.1	GCCAAGCUCACACAGCAGGAA	133	A-109471.2	UUCCUGCUGUGUGAGCUUGGCAG	354	3248	3270
AD-53817.1	A-110711.1	CCAAGCUCACACAGCAGGAAA	134	A-109577.2	UUUCCUGCUGUGUGAGCUUGGCA	355	3249	3271
AD-53787.1	A-110659.1	CAAGCUCACACAGCAGGAACU	135	A-109473.2	AGUUCUGCUGUGUGAGCUUGGC	356	3250	3272
AD-53823.1	A-110712.1	AAGCUCACACAGCAGGAACUU	136	A-109579.2	AAGUUCUGCUGUGUGAGCUUGG	357	3251	3273
AD-53746.1	A-110660.1	CUGAAGCCAAGCCUUCUUA	137	A-109475.2	UAAGAAGAGGCUUGGCUUCAGAG	358	3298	3320
AD-53828.1	A-110713.1	UGAAGCCAAGCCUUCUUA	138	A-109581.2	UUAAGAAGAGGCUUGGCUUCAGA	359	3299	3321
AD-53752.1	A-110661.1	GAAGCCAAGCCUUCUUA	139	A-109477.2	AGUAAAGAAGAGGCUUGGCUUCAG	360	3300	3322
AD-53758.1	A-110662.1	AAGCCAAGCCUUCUUA	140	A-109479.2	AAGUAAAGAAGAGGCUUGGCUUCA	361	3301	3323
AD-53834.1	A-110714.1	AGUGAGGCUUGGGAAGGGGAAA	141	A-109583.2	UUUCCCCUCCCAGCCUCACUGU	362	3355	3377
AD-53764.1	A-110663.1	GUGAGGCUUGGGAAGGGGAAACA	142	A-109481.2	UGUCCCCUCCCAGCCUCACUG	363	3356	3378
AD-53770.1	A-110664.1	GGCUGGGAAGGGGAACACAGA	143	A-109483.2	UCUGUGUCCCCUCCCAGCCUC	364	3360	3382
AD-53776.1	A-110665.1	GAAGGGGAACACAGACCAGGA	144	A-109485.2	UCCUGGUCUGUGUCCCCUCCC	365	3366	3388
AD-53782.1	A-110666.1	AAGGGGAACACAGACCAGGAA	145	A-109487.2	UUCCUGGUCUGUGUCCCCUCCC	366	3367	3389
AD-53794.1	A-110715.1	AGGGGAACACAGACCAGGAAA	146	A-109585.2	UUUCCUGGUCUGUGUCCCCUCCC	367	3368	3390
AD-53788.1	A-110667.1	GGGAACACAGACCAGGAAGCU	147	A-109489.2	AGCUUCCUGGUCUGUGUCCCCU	368	3370	3392
AD-53747.1	A-110668.1	ACUGUCCUCCUUGAGCACCA	148	A-109491.2	UGGUGCUCAAGGAGGACAGUUG	369	3509	3531
AD-53753.1	A-110669.1	CCAGCCCCACCAAGCAAGCA	149	A-109493.2	UGCUUGCUUGGUGGGGCGUGUG	370	3527	3549
AD-53759.1	A-110670.1	CCCCACCAAGCAAGCAGACA	150	A-109495.2	UGUCUGCUUGCUUGGGUGGGGCU	371	3531	3553
AD-53765.1	A-110671.1	CCCACCAAGCAAGCAGACAU	151	A-109497.2	AUGUCUGCUUGCUUGGGUGGGG	372	3532	3554
AD-53771.1	A-110672.1	CCACCAAGCAAGCAGACAU	152	A-109499.2	AAUGUCUGCUUGCUUGGGUGGGG	373	3533	3555
AD-53777.1	A-110673.1	CACCAAGCAAGCAGACAUUU	153	A-109501.2	AAAUGUCUGCUUGCUUGGGUGGG	374	3534	3556
AD-53783.1	A-110674.1	ACCAAGCAAGCAGACAUUA	154	A-109503.2	UAAAUGUCUGCUUGCUUGGGUGG	375	3535	3557
AD-53789.1	A-110675.1	CCAAGCAAGCAGACAUUAU	155	A-109505.2	AUAAAUGUCUGCUUGCUUGGGUG	376	3536	3558
AD-53800.1	A-110716.1	CCAAGCAAGCAGACAUUAU	156	A-109587.2	AAUAAAUGUCUGCUUGCUUGGGU	377	3537	3559
AD-53748.1	A-110676.1	CAAGCAAGCAGACAUUAUCU	157	A-109507.2	AGAUAAAUGUCUGCUUGCUUGGG	378	3538	3560
AD-53754.1	A-110677.1	AAGCAAGCAGACAUUAUCUU	158	A-109509.2	AAGAUAUUUGUCUGCUUGCUUGG	379	3539	3561
AD-53760.1	A-110678.1	AGCAAGCAGACAUUAUCUUU	159	A-109511.2	AAAGAUAUUUGUCUGCUUGCUUG	380	3540	3562
AD-53806.1	A-110717.1	CAAGCAGACAUUAUCUUUU	160	A-109589.2	AAAAAGAUAUUUGUCUGCUUGCU	381	3542	3564
AD-56975.1	A-116394.4		160	A-109589.5		381		
AD-56976.1	A-116407.1		160	A-109589.11		381		
AD-56977.1	A-116406.2		160	A-109589.11		381		
AD-56978.1	A-116418.1		160	A-109589.18		381		
AD-56979.1	A-116393.1	Аналогичная	160	A-109589.6	Аналогичная	381	Аналог	Анал

046901

AD-56980.1	A-116408.1		160	A-109589.12		381	ичная	огичная
AD-56981.1	A-116419.1		160	A-109589.19		381		
AD-56982.1	A-116426.1		160	A-109589.19		381		
AD-56983.1	A-116400.1		160	A-109589.7		381		
AD-56984.1	A-116409.1		160	A-109589.13		381		
AD-56985.1	A-116420.1		160	A-109589.20		381		
AD-56986.1	A-116428.1		160	A-109589.20		381		
AD-56986.2	A-116428.2		160	A-109589.17		381		
AD-56987.1	A-116410.1		160	A-109589.14		381		
AD-56988.1	A-116421.1		160	A-109589.21		381		
AD-56989.1	A-116430.1		160	A-109589.21		381		
AD-56990.1	A-116432.1		160	A-109589.9		381		
AD-56991.1	A-116415.1		160	A-109589.15		381		
AD-56992.1	A-116434.1		160	A-109589.15		381		
AD-56993.1	A-116416.1		160	A-109589.16		381		
AD-56994.1	A-116436.1		160	A-109589.22		381		
AD-56995.1	A-116417.1	Аналогичная	160	A-109589.17	Аналогичная	381		
AD-56996.1	A-116438.1		160	A-109589.17		381	Аналогичная	Аналогичная
AD-56997.1	A-116450.1		160	A-109589.17		381		
AD-56998.1	A-116471.1		160	A-109589.17		381		
AD-56999.1	A-116479.2		160	A-109589.17		381		
AD-57000.1	A-116492.3		160	A-109589.17		381		
AD-57001.1	A-116440.1		160	A-109589.17		381		
AD-57002.1	A-116452.1		160	A-109589.17		381		
AD-57003.1	A-116460.1		160	A-109589.17		381		
AD-57004.1	A-116473.1		160	A-109589.17		381		
AD-57005.1	A-116486.1		160	A-109589.17		381		
AD-57006.1	A-116494.3		160	A-109589.17		381		
AD-57007.1	A-116442.1		160	A-109589.17		381		
AD-57008.1	A-116453.1		160	A-109589.17		381		
AD-57009.1	A-116462.1		160	A-109589.17		381		
AD-57010.1	A-116475.1		160	A-109589.17		381		
AD-57011.1	A-116488.1		160	A-109589.17		381		
AD-57012.1	A-116498.1		160	A-109589.17		381		
AD-57013.1	A-116444.1		160	A-109589.17		381		
AD-57014.1	A-116454.1		160	A-109589.17		381		
AD-57015.1	A-116464.1		160	A-109589.17		381		
AD-57016.1	A-116477.1		160	A-109589.17		381		
AD-57017.1	A-116490.1		160	A-109589.17		381		
AD-57018.1	A-116500.1		160	A-109589.17		381		
AD-57019.1	A-116446.1		160	A-109589.17		381		
AD-57020.1	A-116455.1		160	A-109589.23		381		
AD-57021.1	A-116481.1		160	A-109589.23		381		
AD-57022.1	A-116448.1		160	A-109589.23		381		
AD-57023.1	A-116467.1		160	A-109589.23		381		
AD-57024.1	A-116483.1		160	A-109589.23		381		
AD-57025.1	A-116449.1		160	A-109589.23		381		
AD-57026.1	A-116457.1		160	A-109589.23		381		
AD-57027.1	A-116469.1		160	A-109589.23		381		
AD-53812.1	A-110718.1	AAGCAGACAUUUUUCUUUUGA	161	A-109591.2	UCAAAAGAUAAAUGUCUGCUUGC	382	3543	3565
AD-53818.1	A-110719.1	AGCAGACAUUUUUCUUUUGGA	162	A-109593.2	UCCAAAAGAUAAAUGUCUGCUUG	383	3544	3566
AD-53766.1	A-110679.1	GCAGACAUUUUUCUUUUGGGU	163	A-109513.2	ACCCAAAAGAUAAAUGUCUGCUU	384	3545	3567

046901

AD-53772.1	A-110680.1	AGACAUUUUAUCUUUUGGGUCU	164	A-109515.2	AGACCCAAAAGAUAAAUGUCUGC	385	3547	3569
AD-53824.1	A-110720.1	GACAUUUUAUCUUUUGGGUCUU	165	A-109595.2	AAGACCCAAAAGAUAAAUGUCUG	386	3548	3570
AD-53778.1	A-110681.1	ACAUUUUAUCUUUUGGGUCUGU	166	A-109517.2	ACAGACCCAAAAGAUAAAUGUCU	387	3549	3571
AD-53784.1	A-110682.1	UUUAUCUUUUGGGUCUGUCCU	167	A-109519.2	AGGACAGACCCAAAAGAUAAAUG	388	3552	3574
AD-53829.1	A-110721.1	UUUAUCUUUUGGGUCUGUCCU	168	A-109597.2	AAGGACAGACCCAAAAGAUAAAU	389	3553	3575
AD-53790.1	A-110683.1	UAUCUUUUGGGUCUGUCCUCU	169	A-109521.2	AGAGGACAGACCCAAAAGAUAAA	390	3554	3576
AD-53835.1	A-110722.1	AUCUUUUGGGUCUGUCCUCUU	170	A-109599.2	AAGAGGACAGACCCAAAAGAUAA	391	3555	3577
AD-53796.1	A-110684.1	UCUUUUGGGUCUGUCCUCUU	171	A-109523.2	AGAGAGGACAGACCCAAAAGAUAA	392	3556	3578
AD-53802.1	A-110685.1	UUUUGGGUCUGUCCUCUGU	172	A-109525.2	ACAGAGAGGACAGACCCAAAAGA	393	3558	3580
AD-53808.1	A-110686.1	UUUGGGUCUGUCCUCUGUU	173	A-109527.2	AACAGAGAGGACAGACCCAAAAG	394	3559	3581
AD-53795.1	A-110723.1	UUUGGGUCUGUCCUCUGUUU	174	A-109601.2	AAACAGAGAGGACAGACCCAAA	395	3560	3582
AD-53801.1	A-110724.1	UGGGUCUGUCCUCUCUGUUGA	175	A-109603.2	UCAACAGAGAGGACAGACCCAAA	396	3561	3583
AD-53807.1	A-110725.1	GGGUCUGUCCUCUCUGUUGCA	176	A-109605.2	UGCAACAGAGAGGACAGACCCAA	397	3562	3584
AD-53814.1	A-110687.1	GGUCUGUCCUCUCUGUUGCCU	177	A-109529.2	AGGCAACAGAGAGGACAGACCCA	398	3563	3585
AD-53820.1	A-110688.1	GUCUGUCCUCUCUGUUGCCUU	178	A-109531.2	AAGGCAACAGAGAGGACAGACCC	399	3564	3586
AD-53825.1	A-110689.1	UCUGUCCUCUCUGUUGCCUUU	179	A-109533.2	AAAGGCAACAGAGAGGACAGACC	400	3565	3587
AD-53831.1	A-110690.1	CUGUCCUCUCUGUUGCCUUUU	180	A-109535.2	AAAAGGCAACAGAGAGGACAGAC	401	3566	3588
AD-53791.1	A-110691.1	UGUCCUCUCUGUUGCCUUUUU	181	A-109537.2	AAAAAGGCAACAGAGAGGACAGA	402	3567	3589
AD-53797.1	A-110692.1	GUCCUCUCUGUUGCCUUUUUA	182	A-109539.2	UAAAAAGGCAACAGAGAGGACAG	403	3568	3590
AD-48400.1	A-98247.2	UUUUCUAGACCGUUUUUGCUU	183	A-93455.4	AAGCAAAACAGGUCUAGAAAAGU	404	3597	3619
AD-53830.1	A-110872.1			A-110873.1				
AD-53803.1	A-110693.1	UUUCUAGACCGUUUUUGCUUU	184	A-109541.2	AAAGCAAAACAGGUCUAGAAAAG	405	3598	3620
AD-53809.1	A-110694.1	UUCUAGACCGUUUUUGCUUUU	185	A-109543.2	AAAAGCAAAACAGGUCUAGAAAA	406	3599	3621
AD-53813.1	A-110726.1	UCUAGACCGUUUUUGCUUUUU	186	A-109607.2	AAAAAGCAAAACAGGUCUAGAAA	407	3600	3622
AD-53815.1	A-110695.1	CUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	187	A-109545.2	ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	408	3601	3623
AD-56610.1	A-115523.2			A-115525.1		408		
AD-56611.1	A-115533.2			A-115534.1		408		
AD-56612.1	A-115536.2	Аналогичная	187	A-115540.3	Аналогичная	408		Анал огичн ая
AD-56613.1	A-115538.3		187	A-115541.5		408		
AD-56614.1	A-110695.9		187	A-115548.1		408		
AD-56615.1	A-110695.5		187	A-115519.1		408		
AD-56616.1	A-115523.3		187	A-115526.1		408		
AD-56617.1	A-115535.1		187	A-109545.7		408		
AD-56618.1	A-115537.2		187	A-115540.4		408		
AD-56619.1	A-115539.3		187	A-115541.6		408		
AD-56620.1	A-115542.2		187	A-115548.2		408		
AD-56621.1	A-115520.1		187	A-115519.2		408		
AD-56622.1	A-115527.1		187	A-115526.2		408		
AD-56623.1	A-115536.1		187	A-109545.8		408		
AD-56624.1	A-115538.2		187	A-115540.5		408		
AD-56625.1	A-115542.1		187	A-109545.12		408		
AD-56626.1	A-115543.2		187	A-115548.3		408		
AD-56627.1	A-115521.1		187	A-115519.3		408		
AD-56628.1	A-115527.2		187	A-115528.1		408		
AD-56629.1	A-115537.1		187	A-109545.9		408		
AD-56630.1	A-115539.2		187	A-115540.6		408		
AD-56631.1	A-115543.1		187	A-109545.13		408		
AD-56632.1	A-115544.2		187	A-115548.4		408		
AD-56633.1	A-115520.2		187	A-109545.6		408		
AD-56634.1	A-115529.1		187	A-115530.1		408		
AD-56635.1	A-115538.1		187	A-109545.10		408		
AD-56636.1	A-110695.8		187	A-115541.1		408		

046901

AD-56637.1	A-115544.1	Аналогичная	187	A-109545.14	Аналогичная	408						
AD-56638.1	A-115545.2		187	A-115548.5		408						
AD-56639.1	A-115520.3		187	A-115522.1		408						
AD-56640.1	A-115529.2		187	A-115531.1		408						
AD-56641.1	A-115539.1		187	A-109545.11		408						
AD-56642.1	A-115535.3		187	A-115541.2		408						
AD-56643.1	A-115545.1		187	A-109545.15		408						
AD-56644.1	A-115546.2		187	A-115548.6		408						
AD-56645.1	A-110695.6		187	A-115522.2		408						
AD-56646.1	A-115529.3		187	A-115532.1		408						
AD-56647.1	A-110695.7		187	A-115540.1		408						
AD-56648.1	A-115536.3		187	A-115541.3		408						
AD-56649.1	A-115546.1		187	A-109545.16		408						
AD-56650.1	A-115547.2		187	A-115548.7		408						
AD-56651.1	A-115523.1		187	A-115524.1		408						
AD-56652.1	A-115533.1		187	A-115532.2		408						
AD-56653.1	A-115535.2		187	A-115540.2		408						
AD-56654.1	A-115537.3		187	A-115541.4		408						
AD-56655.1	A-115547.1		187	A-109545.17		408						
AD-56656.1	A-110695.10		187	A-115549.1		408						
AD-56657.1	A-115550.1		187	A-115551.1		408						
AD-56658.1	A-115564.1		187	A-115565.1		408						
AD-56659.1	A-110695.12		187	A-115579.1		408						
AD-56662.1	A-115542.3		187	A-115549.2		408						
AD-56663.1	A-115552.1		187	A-115553.1		408						
AD-56664.1	A-115566.1		187	A-115567.1		408						
AD-56668.1	A-115543.3		Аналогичная	187		A-115549.3			Аналогичная	408		
AD-56669.1	A-115554.1			187		A-115555.1				408		
AD-56670.1	A-115568.1	187		A-115569.1	408							
AD-56673.1	A-115544.3	187		A-115549.4	408							
AD-56674.1	A-115556.1	187		A-115557.1	408							
AD-56678.1	A-115545.3	187		A-115549.5	408							
AD-56679.1	A-115558.1	187		A-115559.1	408							
AD-56680.1	A-115572.1	187		A-115573.1	408							
AD-56683.1	A-115546.3	187		A-115549.6	408							
AD-56684.1	A-115560.1	187		A-115561.1	408							
AD-56685.1	A-115574.1	187		A-115575.1	408							
AD-56688.1	A-115547.3	187		A-115549.7	408							
AD-56689.1	A-115535.4	187		A-115562.1	408							
AD-56690.1	A-115542.4	187		A-115576.1	408							
AD-56693.1	A-115520.4	187		A-115563.1	408							
AD-56694.1	A-115577.1	187		A-115578.1	408							
AD-53821.1	A-110696.1	UAGACCGUUUUGCUUUUGUA		188	A-109547.2	UACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	409	3602		3624		
AD-56660.1	A-115594.1	Аналогичная		189	A-115595.1	Аналогичная	410	3603		3623		
AD-56661.1	A-115580.2			189	A-115610.1		410					
AD-56665.1	A-115580.1			189	A-115581.1		410					
AD-56666.1	A-115596.1		189	A-115597.1	410							
AD-56667.1	A-115611.1		GACCGUUUUGCUUUUGU	190	A-115612.1		ACAAAAGCAAAACAGGUCAUA		411		3603	3623
AD-56671.1	A-115582.1	Аналогичная	191	A-115583.1	Аналогичная	412	3603	3623				
AD-56672.1	A-115598.1		191	A-115599.1		412						
AD-56676.1	A-115584.1		191	A-115585.1		412						
AD-56677.1	A-115600.1		191	A-115601.1		412						
										Аналог	Анал	

046901

AD-56681.1	A-115586.1	Аналогичная	191	A-115587.1	Аналогичная	412	ичная	огичная
AD-56682.1	A-115602.1		191	A-115603.1		412		
AD-56686.1	A-115588.1		191	A-115589.1		412		
AD-56687.1	A-115604.1		191	A-115605.1		412		
AD-56691.1	A-115590.1		191	A-115591.1		412		
AD-56692.1	A-115606.1		191	A-115607.1		412		
AD-56695.1	A-115592.1		191	A-115593.1		412		
AD-56696.1	A-115608.1		191	A-115609.1		412		
AD-53826.1	A-110697.1		UUUUGUAACUUGAAGAUUUU	192		A-109549.2		
AD-53832.1	A-110698.1	UUUGUAACUUGAAGAUUUUA	193	A-109551.2	UAAAAUCUUCUAGUUACAAAAG	414	3617	3639
AD-53792.1	A-110699.1	UUGUAACUUGAAGAUUUUAU	194	A-109553.2	AUAAAAUCUUCUAGUUACAAA	415	3618	3640
AD-53798.1	A-110700.1	UGUAACUUGAAGAUUUUUUU	195	A-109555.2	AAUAAAAUCUUCUAGUUACAAA	416	3619	3641
AD-53819.1	A-110727.1	GUAACUUGAAGAUUUUUUUU	196	A-109609.2	AAAAAAAUCUUCUAGUUACAA	417	3620	3642
AD-53815.1		CUAGACCUUUUUGCUUUUGU	197		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	418	3601	
AD-57928.40		Аналогичная	197		Аналогичная	418		
AD-59182.5			197			418		
AD-59184.3			197			418		
AD-59186.3			197			418		
AD-59171.13			197			418		
AD-59176.7			197			418		
AD-59170.7			197			418		
AD-59175.7		Аналогичная	197		Аналогичная	418		
AD-59179.7			197			418		
AD-59218.1			197			418		
AD-59222.1			197			418		
AD-59226.1			197			418		
AD-59230.1			197			418		
AD-59235.1			197			418		
AD-59207.1			197			418		
AD-59211.1			197			418		
AD-59215.1			197			418		
AD-59219.1			197			418		
AD-59223.1			197			418		
AD-59181.5			197			418		
AD-59172.5			197			418		
AD-59177.5		197		418				
AD-59180.5		197		418				
AD-59183.5		197		418				
AD-59185.5		197		418				

AD-59173.5			197			418		
AD-59232.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUUUGU	198		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	419	3600	
AD-59236.1		Аналогичная	198		Аналогичная	419	Аналогичная	
AD-59216.1			198			419		
AD-59220.1			198			419		
AD-59224.1			198			419		
AD-59228.1			198			419		
AD-59233.1			198			419		
AD-59237.1			198			419		
AD-59209.1			198			419		
AD-59208.1			198			419		
AD-59212.1			CUAGACCUGUUUUGCUUUUUGU	199				ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA
AD-59210.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUUUGU	200		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	421	3601	
AD-59214.1		AGACCUGUUUUGCUUUUUGU	201		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	422	3603	
AD-59227.1		Аналогичная	201		Аналогичная	422		
AD-59231.1			201			422		
AD-59198.3			201			422		
AD-59200.3			201			422		
AD-59203.3		Аналогичная	201		Аналогичная	422		
AD-59204.3			201			422		
AD-59188.3			201			422		
AD-59191.3			201			422		
AD-59213.1			201			422		
AD-59217.1			201			422		
AD-59221.1			201			422		
AD-59225.1			201			422		
AD-59229.1			201			422		
AD-59234.1			201			422		
AD-59238.1			201			422		
AD-59241.1			201			422		
AD-59245.1			201			422		
AD-59250.1			201			422		
AD-59246.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUUUGU	202		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	423	3602	
AD-59253.2		UAGACCUGUUUUGCUUUUUGU	203		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	424	3602	
AD-59242.1		AGACCUGUUUUGCUUUUUGU	204		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	425	3602	
AD-59253.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUUGU	205		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	426	3602	

046901

AD-59258.1		UAGACCGUUUUUGCUUUUGU	206		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	427	3602	
AD-59251.1		CUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	207		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	428	3603	
AD-59256.1		UAGACCGUUUUUGCUUUUGU	208		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	429	3604	
AD-59260.1		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	209		ACAAAAGCAAAACAGGUCU	430	3605	
AD-59248.1		GACCGUUUUUGCUUUUGU	210		ACAAAAGCAAAACAGGUCU	431	3605	
AD-59247.1		GACCGUUUUUGCUUUUGU	211		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	432	3604	
AD-59252.1		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	212		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	433	3604	
AD-59257.1		UAGACCGUUUUUGCUUUUGU	213		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	434	3604	
AD-59261.1		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	214		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	435	3603	
AD-59262.1		UAGACCGUUUUUGCUUUUGU	215		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	436	3603	
AD-59265.1		CUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	216		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	437	3603	
AD-59196.13		UAGACCGUUUUUGCUUUUGU	217		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	438	3601	
AD-59189.11		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	218		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	439	3601	
AD-59190.3		UCUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	219		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	440	3601	
AD-59192.3		UUCUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	220		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	441	3601	
AD-59240.1			220			441		
AD-59244.1			220			441		
AD-59202.7		Аналогичная	220		Аналогичная	441	Аналогичная	
AD-59195.5			220			441		
AD-59249.1			220			441		
AD-59254.1			220			441		
AD-59259.1			220			441		
AD-59264.1			220			441		
AD-59264.2			220			441		
AD-59255.1			220			441		
AD-57928.1			220			441		
AD-58893.1			220			441		
AD-58894.1			220			441		
AD-58895.1			220			441		
AD-58896.1			220			441		
AD-58897.1			220			441		
AD-58898.1			220			441		
AD-58899.1			220			441		
AD-58900.1		CAAGCAGACAUUUUAUCUUUUU	221		AAAAAGAUAAAUGUCUGCUUGCU	442	N/A	
AD-58902.1		UUUUUCUAGACCGUUUUUGCUU	222		AAGCAAAACAGGUCUAGAAAAGU	443	3597	

		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	223		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	444		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	224		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	445		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	225		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	446		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	226		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	447		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	227		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	448		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	228		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	449		
		CUAGACCGUUUUUGCUUUUGU			ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA			
		Аналогичная	229		Аналогичная	450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU	230		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	451		
			231			452		
		AGACCGUUUUUGCUUUUGU			ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG			
		CUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	232		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	453		
		Аналогичная	232		Аналогичная	453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
		CUAGACCGUUUUUGCUUUUGU	233		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	454		
		Аналогичная	233		Аналогичная	454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
		Аналогичная	233		Аналогичная	454		
			233			454		

AD-53700.1	A-110621.1	GfgCfcUfgGfuUfcCfcUfgAfgGfa CfaAfl96	465	1640	A-109397.2	uGfgUfcCfuCfaGfGgaAfcCf aGfgCfcsUfsc	1016
AD-53701.1	A-110629.1	CfgCfuUfuUfgGfgGfgUfgAfgGfg UfgUfl96	466	1901	A-109413.2	aCfaCfcCfuCfaCfccCfaAf aAfgCfcsUfsc	1017
AD-48400.1	A-98247.2	UfuUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfl96	467		A-93455.4	aAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfu AfgAfaAfasGfsu	1018
AD-53656.1	A-110551.1	CfcGfgGfgAfuAfcCfcUfaCfaCfa GfaUfl96	468	674	A-109257.2	aUfcUfuGfgUfgAfgguAfuC fcCfcGfcsCfsg	1019
AD-53657.1	A-110559.1	CfcAfuGfuCfcAfcUfaCfaUfcGfa GfgAfl96	469	776	A-109273.2	uCfcUfcGfaUfgUfaguCfGfa fcAfuGfcsGfsg	1020
AD-53658.1	A-110567.1	CfuGfgUfgGfaGfgUfgUfaUfcUfc CfuAfl96	470	897	A-109289.2	uAfgGfaGfaUfaCfaccUfcCf aCfcAfgsGfsc	1021
AD-53659.1	A-110575.1	AfgAfcAfcCfaGfcAfaUfaAfgAfg UfgAfl96	471	917	A-109305.2	uCfaCfuCfuAfuAfgUfgG fuGfuCfusAfg	1022
AD-53660.1	A-110583.1	CfaGfgGfuCfaUfgGfgUfaCfcGfa CfuUfl96	472	956	A-109321.2	aAfgUfcGfgUfgUfaccUfgA fcCfcUfcsCfsc	1023
AD-53702.1	A-110590.1	CfuGfcGfcGfuGfcUfaCfuGfc CfaAfl96	473	1110	A-109335.2	uUfgGfcAfgUfgUfaccCfcG fcGfcAfgsGfsc	1024
AD-53703.1	A-110598.1	AfgGfcCfuGfgAfgUfuUfaUfcGfg GfaAfl96	474	1160	A-109351.2	uUfcCfcAfaUfaAfaCfcAf gGfcCfusAfsu	1025
AD-53704.1	A-110606.1	CfaAfcUfuUfgGfcCfcCfuGfuGfu GfgAfl96	475	1421	A-109367.2	uCfcAfcAfcAfgCfGgcCfaAf aGfuUfcsGfsu	1026
AD-53705.1	A-110614.1	GfuUfgAfgGfcAfgAfcUfgAfu CfaAfl96	476	1592	A-109383.2	uGfgAfuCfaGfuCfuGfcC fuCfaAfcUfsc	1027
AD-53706.1	A-110622.1	GfgUfaCfuGfaCfcCfcCfaAfcCfu GfgUfl96	477	1664	A-109399.2	aCfcAfgGfuUfgGfgggUfcA fgUfaCfcsCfsg	1028
AD-53707.1	A-110630.1	CfuUfuUfgGfgGfgUfgAfgGfgUf gUfcUfl96	478	1903	A-109415.2	aGfaCfaCfcCfuCfaccCfcCf aAfaAfgsCfsg	1029
AD-53661.1	A-110544.1	AfcCfcGfuGfcGfcCfaAfgGfaUfc CfgUfl96	479	556	A-109243.2	aCfcGfaUfcCfuUfggcGfcAf gCfcGfusGfsg	1030
AD-53663.1	A-110560.1	UfcGfaCfuAfcAfcUfcGfgAfgGfg AfcUfl96	480	781	A-109275.2	aGfuCfcUfcCfuCfaguGfuA fgUfcGfasCfca	1031
AD-53664.1	A-110568.1	GfgUfgGfaGfgUfgUfaUfcUfcCfu AfgAfl96	481	899	A-109291.2	uCfuAfgGfaGfaUfacaCfcU fcCfaCfcsAfg	1032
AD-53665.1	A-110576.1	CfaCfcAfgCfaUfaCfaGfaGfuGfa CfaAfl96	482	920	A-109307.2	uGfgUfcAfcUfcUfguaUfgC fuGfgUfcsUfsc	1033
AD-53666.1	A-110584.1	GfgUfcAfuGfgUfcCfcCfcAfcUfu CfgAfl96	483	959	A-109323.2	uCfcAfaGfuCfcGfgGfaCfcA fuGfaCfcsCfsu	1034
AD-53708.1	A-110591.1	CfgUfgCfuCfaAfcUfgCfcAfaGfg GfaAfl96	484	1115	A-109337.2	uUfcCfcUfuGfgCfaguUfgA fgCfaCfcsCfsg	1035
AD-53709.1	A-110599.1	GfgCfcUfgGfaGfuUfuAfuUfcGfg AfaAfl96	485	1161	A-109353.2	uUfuCfcGfaAfaAfaCfcC faGfgCfcsUfsc	1036
AD-53710.1	A-110607.1	UfuGfgCfcGfcUfgUfgUfgGfaCfc UfcUfl96	486	1426	A-109369.2	aGfaGfgUfcCfaCfacaGfcGf gCfcAfasAfg	1037

AD-53711.1	A-110615.1	UfgAfgGfcAfgAfcUfgAfuCfcAfcUfl96	487	1594	A-109385.2	aGfuGfgAfuCfaGfucuCfuGfcCfuCfasAfc	1038
AD-53712.1	A-110623.1	GfuUfgGfcAfgCfuUfgUfuUfgCfaGfgAfl96	488	1717	A-109401.2	uCfuUfgCfaAfaAfcagCfuGfcCfaAfcscfsc	1039
AD-53713.1	A-110631.1	UfuUfuGfgGfgGfUfgGfgGfuGfuGfuCfuAfl96	489	1904	A-109417.2	uAfgAfcAfcCfcUfcacCfcCfcAfaAfasGfsc	1040
AD-53667.1	A-110545.1	GfcUfgCfcAfaAfcGfgAfuCfcGfuGfgAfl96	490	559	A-109245.2	uCfcAfcGfgAfuCfcuuGfgCfcCfaGfcsGfsg	1041
AD-53668.1	A-110553.1	AfuAfcCfuCfaCfcAfaGfaUfcCfuGfcAfl96	491	680	A-109261.2	uGfcAfgGfaUfcUfuggUfgAfgGfuAfcsc	1042
AD-53669.1	A-110561.1	AfcUfaCfaUfcGfaAfgAfgAfcUfcCfuCfcUfl96	492	784	A-109277.2	aGfgAfgUfcUfcCfcuGfaUfgUfaGfusCfsg	1043
AD-53670.1	A-110569.1	UfgGfaGfgUfgUfaUfcUfcCfuAfgAfcAfl96	493	901	A-109293.2	uGfuCfuAfgGfaGfaaCfaCfcUfcCfasCfsc	1044
AD-53671.1	A-110577.1	UfaCfaGfaGfuGfaAfcAfcCfcGfgGfgAfaAfl96	494	928	A-109309.2	uUfuCfcCfcGfgGfgucAfcUfcUfgUfasUfsg	1045
AD-53672.1	A-110585.1	UfcAfuGfgUfcAfcCfcAfcUfuCfcAfgAfl96	495	961	A-109325.2	uCfuCfcGfaGfaCfcGfgGfaCfcAfuGfasCfsc	1046
AD-53714.1	A-110592.1	CfaCfcCfuCfaUfaAfgGfgCfcUfgGfaGfuUfl96	496	1151	A-109339.2	aAfcUfcCfaGfgCfcuaUfgAfgGfgUfsgCfsc	1047
AD-53715.1	A-110600.1	GfcCfuGfgAfgUfuUfaUfuCfcGfgAfaAfl96	497	1162	A-109355.2	uUfuUfcCfcAfaUfaaaCfuCfcAfgGfcsCfsc	1048
AD-53716.1	A-110608.1	UfgGfcCfcCfuGfuGfgAfcCfuCfuUfl96	498	1427	A-109371.2	aAfgAfgGfuCfcAfcAfcAfcCfcGfcCfasAfsa	1049
AD-53717.1	A-110616.1	GfaGfgCfaGfaGfaAfcUfcCfaCfuUfl96	499	1595	A-109387.2	aAfgUfgGfaUfcAfcUfcUfcUfcCfcUfcsAfsa	1050
AD-53718.1	A-110624.1	UfgGfcAfgCfuGfuUfuUfgCfaGfgAfcUfl96	500	1719	A-109403.2	aGfuCfcUfgCfaAfaaacAfgCfcUfcCfasAfc	1051
AD-53719.1	A-110632.1	GfgGfgUfgAfgGfgUfgUfcUfaCfcCfcAfl96	501	1909	A-109419.2	uGfgCfcUfaGfaCfaccCfuCfcAfcCfcsCfsc	1052
AD-53674.1	A-110554.1	CfaCfcAfaGfaUfcCfcGfaAfuGfuCfuUfl96	502	686	A-109263.2	aAfgAfcAfuGfcAfggaUfcUfuGfgUfsgAfsa	1053
AD-53675.1	A-110562.1	UfaCfaUfcGfaGfgAfgGfaCfuCfcUfcUfl96	503	786	A-109279.2	aGfaGfgAfgUfcCfcuUfcGfaUfgUfasGfsc	1054
AD-53676.1	A-110570.1	AfgGfuGfuAfuCfuCfcUfaGfaCfaCfcAfl96	504	904	A-109295.2	uGfgUfgUfcUfaGfgagAfuAfcAfcCfusCfsc	1055
AD-53677.1	A-110578.1	AfcAfgAfgUfgAfcCfcCfcGfgGfaAfaUfl96	505	929	A-109311.2	aUfuUfcCfcGfgUfgguCfaCfuCfuGfusAfsu	1056
AD-53678.1	A-110586.1	AfgGfaCfcGfgAfcCfcGfcUfuCfcAfcAfl96	506	994	A-109327.2	uGfuGfgAfaGfcGfgguCfcCfcUfcCfusCfsc	1057
AD-53720.1	A-110593.1	AfcCfcUfcAfuAfgGfgCfuGfgAfgUfuUfl96	507	1152	A-109341.2	aAfaCfuCfcAfgGfcuuAfuGfaGfgGfusGfsc	1058
AD-53721.1	A-110601.1	GfgAfgUfuUfaUfuCfcGfgAfaAfgCfcAfl96	508	1166	A-109357.2	uGfgCfuUfuUfcCfcgaaUfaAfaCfuCfcsAfsa	1059

AD-53722.1	A-110609.1	GfgCfcGfcUfgUfGfUfgGfaCfcUfcUfuUfl96	509	1428	A-109373.2	aAfaGfaGfgUfcCfacaCfaGfcGfgCfcsAfsa	1060
AD-53723.1	A-110617.1	GfgCfaGfaGfaCfuUfGfaUfcCfaCfuUfcUfl96	510	1597	A-109389.2	aGfaAfgUfgGfaUfcagUfcUfcUfgCfcsUfsc	1061
AD-53724.1	A-110625.1	GfcAfgCfuGfuUfuUfgCfaGfgAfcUfgUfl96	511	1721	A-109405.2	aCfaGfuCfcUfgCfaaaAfcAfgCfuGfcsCfsa	1062
AD-53725.1	A-110633.1	GfgGfuGfaGfgGfUfGfuCfuAfcGfcCfaUfl96	512	1910	A-109421.2	aUfgGfcGfuAfgAfcacCfcUfcAfcCfcsCfsc	1063
AD-53679.1	A-110547.1	CfuAfcGfuGfgUfGfGfuGfcUfgAfaGfgAfl96	513	593	A-109249.2	uCfcUfuCfaGfcAfccaCfcAfcGfuAfgsGfsu	1064
AD-53680.1	A-110555.1	CfaAfgAfuCfcUfGfCfaUfgUfcUfuCfaAfl96	514	689	A-109265.2	uGfgAfaGfaCfaUfgcaGfgAfuCfuUfsgsGfsu	1065
AD-53681.1	A-110563.1	UfcGfaGfgAfgGfAfcUfcUfcUfgUfcUfl96	515	790	A-109281.2	aGfaCfaGfaGfgAfgucCfuCfcUfcGfasUfsg	1066
AD-53682.1	A-110571.1	GfuAfuCfuCfcUfAfgAfaCfaCfcAfgCfaUfl96	516	908	A-109297.2	aUfgCfuGfgUfgUfcuaGfgAfgAfuAfcAfcsc	1067
AD-53683.1	A-110579.1	GfaGfuGfaCfcAfcCfGfgGfgAfaAfuCfaAfl96	517	932	A-109313.2	uCfaGfuUfcUfcCfGgucGfgUfcAfcUfcUfsg	1068
AD-53684.1	A-110587.1	CfgGfgAfcCfcGfCfuCfcAfcAfgAfcAfl96	518	998	A-109329.2	uGfuCfuGfuGfgAfgcGfgGfuCfcCfcsUfsc	1069
AD-53726.1	A-110594.1	CfcCfuCfaUfaGfgCfcUfgGfaGfuUfuAfl96	519	1153	A-109343.2	uAfaAfcUfcCfaGfgccUfaUfgAfgGfgsUfsg	1070
AD-53727.1	A-110602.1	GfuUfuAfuUfcGfgAfaAfaGfcCfaGfcUfl96	520	1169	A-109359.2	aGfcUfgGfcUfuUfuccGfaAfuAfaAfcUfsc	1071
AD-53728.1	A-110610.1	UfgUfgUfgGfaCfcUfcUfuUfgCfcCfaAfl96	521	1434	A-109375.2	uGfgGfgCfaAfaGfaggUfcCfaCfaCfasGfsc	1072
AD-53729.1	A-110618.1	CfaGfaGfaCfuGfAfuCfaCfuUfcUfcUfl96	522	1599	A-109391.2	aGfaGfaAfgUfgGfagUfcUfcUfcUfsgCfsc	1073
AD-53730.1	A-110626.1	UfcUfgCfcGfgGfCfcAfcAfaCfcGfuUfl96	523	1885	A-109407.2	aAfgCfgUfuGfuGfggCfcGfgCfaGfasCfsc	1074
AD-53731.1	A-110634.1	GfgUfgAfgGfgUfgUfcUfaCfcCfcAfuUfl96	524	1911	A-109423.2	aAfuGfgCfgUfaGfacaCfcCfcUfaCfcsCfsc	1075
AD-53685.1	A-110548.1	CfcCfcGfcGfgGfAfuAfcCfuCfaCfcAfl96	525	670	A-109251.2	uGfgUfgAfgGfuAfuCfcGfgCfcGfgGfgsCfsa	1076
AD-53687.1	A-110564.1	CfgAfgGfaGfgAfcUfcCfuCfuGfuCfuUfl96	526	791	A-109283.2	aAfgAfcAfgAfgGfagucCfcUfcCfuCfcsAfsu	1077
AD-53688.1	A-110572.1	UfaUfcUfcCfuAfgAfcAfcCfaGfcAfuAfl96	527	909	A-109299.2	uAfuGfcUfgGfuGfucUfgGfaGfaUfasCfsa	1078
AD-53689.1	A-110580.1	GfgAfaAfuCfgAfgGfgCfaGfgGfuCfaUfl96	528	944	A-109315.2	aUfgAfcCfcUfgCfcucCfcAfuUfcUfcCfcsCfsg	1079
AD-53690.1	A-110588.1	UfcCfaCfaGfaCfaGfgCfcAfgCfaAfgUfl96	529	1009	A-109331.2	aCfuUfgCfuGfgCfcugUfcUfgUfgGfasAfsu	1080
AD-53732.1	A-110595.1	CfcUfcAfuAfgGfCfcUfgGfgAfuUfaUfl96	530	1154	A-109345.2	aUfaAfaCfuCfcAfggCfcUfaUfgAfgsGfsu	1081

AD-53733.1	A-110603.1	GfgGfcUfgGfgGfUfcFgUfgCfuGfgUfcAfl96	531	1279	A-109361.2	uGfaCfcAfgCfaCfagacCfcCfaGfcCfcsUfsc	1082
AD-53734.1	A-110611.1	GfgGfaGfgAfcAfcUfcUfuGfgUfgCfcUfl96	532	1456	A-109377.2	aGfgCfaCfaCfaUfgauGfuCfcUfcCfcsCfsu	1083
AD-53735.1	A-110619.1	AfcUfgAfuCfcAfcUfuCfuCfuGfcCfaAfl96	533	1604	A-109393.2	uUfgGfcAfgAfgAfgauGfgAfuCfaGfusCfsu	1084
AD-53736.1	A-110627.1	CfuGfcCfGfgCfcCfaCfaAfcGfcUfuUfl96	534	1886	A-109409.2	aAfaGfcGfuUfgUfgggCfcCfGfcAfgsAfsC	1085
AD-53737.1	A-110635.1	AfgGfgUfgUfcUfcAfcCfcCfaUfgCfcAfl96	535	1915	A-109425.2	uGfgCfaAfuGfgCfGuaGfaCfaCfcCfusCfsa	1086
AD-53691.1	A-110549.1	CfcGfcCfGfgGfaUfaCfcUfcAfcCfaAfl96	536	671	A-109253.2	uUfgGfuGfaGfgUfaucCfcCfGfcGfgsGfsc	1087
AD-53692.1	A-110557.1	GfuUfgCfcCfcAfcUfcUfgCfcAfcUfaCfaUfl96	537	770	A-109269.2	aUfgUfaGfuCfcAfcUfcUfgGfgCfaAfcUfsc	1088
AD-53693.1	A-110565.1	GfuAfcCfGfgCfcGfaUfgAfaUfaCfcAfl96	538	857	A-109285.2	uGfgUfaUfuCfaUfccCfcCfGfuAfcCfsg	1089
AD-53694.1	A-110573.1	UfcUfcCfuAfcAfcCfaGfcAfuAfcAfl96	539	911	A-109301.2	uGfuAfuGfcUfgGfugufcuAfgGfaGfasUfsc	1090
AD-53695.1	A-110581.1	AfaUfcGfaGfgGfcAfgGfgUfcAfuGfgUfl96	540	947	A-109317.2	aCfcAfuGfaCfcCfcGfcCfcUfcGfaUfusUfsc	1091
AD-53738.1	A-110596.1	CfuCfaUfaGfgCfcUfgGfaGfuUfuAfuUfl96	541	1155	A-109347.2	aAfuAfaAfcUfcCfcGfcCfcUfaUfgAfgsGfsg	1092
AD-53739.1	A-110604.1	GfgUfcAfcCfcUfcUfcCfcGfcAfaCfuUfl96	542	1295	A-109363.2	aAfgUfuGfcCfcGfcCfcGfgGfuGfaCfcsAfsG	1093
AD-53740.1	A-110612.1	AfcUfgCfaGfcAfcCfcUfuUfgUfgUfl96	543	1483	A-109379.2	aCfaCfaAfaGfcAfgguGfcUfgCfaGfusCfsg	1094
AD-53741.1	A-110620.1	AfuCfcAfcUfuCfcUfcGfcCfaAfaGfaUfl96	544	1608	A-109395.2	aUfcUfuUfgGfcAfgagAfaGfuGfgAfusCfsa	1095
AD-53742.1	A-110628.1	GfcCfcAfcAfaCfcGfcUfuUfgGfgGfgUfl96	545	1893	A-109411.2	aCfcCfcCfaAfaAfgcgUfuGfgUfgGfcsCfsc	1096
AD-53743.1	A-110636.1	GfuGfuCfuAfcGfcCfaUfuGfcCfaGfgUfl96	546	1918	A-109427.2	aCfcUfgGfcAfaUfggcGfuAfgAfcAfcCfsc	1097
AD-53744.1	A-110644.1	GfgAfaUfgCfaAfaGfgCfaAfgGfaGfcAfl96	547	2180	A-109443.2	uGfcUfcCfuUfgAfcuuUfgCfaUfuCfcsAfsG	1098
AD-53745.1	A-110652.1	UfgAfuGfgCfcCfcUfcUfcCfaGfcUfl96	548	2906	A-109459.2	aGfcUfgGfaGfaUfgagGfcCfcAfuCfasGfsc	1099
AD-53746.1	A-110660.1	CfuGfaAfgCfcAfaGfcCfcUfuUfcUfuAfl96	549	3300	A-109475.2	uAfaGfaAfgAfgGfcuuGfgCfuUfcAfgsAfsG	1100
AD-53747.1	A-110668.1	AfcUfgUfcCfcUfcCfcUfgAfgCfaCfcAfl96	550	3511	A-109491.2	uGfgUfgCfuCfaAfggaGfgGfaCfaGfusUfsg	1101
AD-53748.1	A-110676.1	CfaAfgCfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfl96	551	3540	A-109507.2	aGfaUfaAfaUfcUfcugCfuUfgCfuUfgsGfsg	1102
AD-53790.1	A-110683.1	UfaUfcUfuUfuGfgGfcUfuGfuCfcUfcUfl96	552	3556	A-109521.2	aGfaGfgAfcAfgAfcCcaAfaAfaGfaUfasAfsa	1103

AD-53791.1	A-110691.1	UfgUfcCfuCfuUfgUfgCfcUfuUfuUfL96	553	3569	A-109537.2	aAfaAfaGfgCfaAfcagAfgAfgGfaCfasGfsa	1104
AD-53792.1	A-110699.1	UfuGfuAfaCfuUfgGfAfaGfaUfaUfuUfaUfL96	554	3620	A-109553.2	aUfaAfaUfaUfcUfuaAfgUfuAfcAfasAfsa	1105
AD-53793.1	A-110707.1	CfuUfuAfcUfcUfgGfCfuCfuAfuGfcCfaAfl96	555	3055	A-109569.2	uUfgGfcAfuAfgAfgcaGfaGfuAfaAfgsGfsu	1106
AD-53794.1	A-110715.1	AfgGfgGfaAfcAfcAfgAfcCfaGfgAfaAfl96	556	3370	A-109585.2	uUfuCfcUfgGfuCfuguGfuUfcCfcFusUfsc	1107
AD-53795.1	A-110723.1	UfuGfgGfuCfuGfuUfcUfcUfcUfgUfuUfL96	557	3562	A-109601.2	aAfaCfaGfaGfaGfgacAfgAfcCfcAfasAfsa	1108
AD-53749.1	A-110637.1	UfgCfaGfcGfuCfcAfcAfcAfgCfuCfaAfl96	558	1962	A-109429.2	uGfgAfgCfuGfuGfuggAfgCfcUfgCfasGfsu	1109
AD-53750.1	A-110645.1	AfaUfcCfcGfgCfcCfcUfcAfgGfaGfaAfl96	559	2204	A-109445.2	uGfcUfcCfuGfaGfgggCfcGfgGfaUfusCfsc	1110
AD-53751.1	A-110653.1	UfuUfcUfgGfaUfgGfgCfuCfuAfgCfaAfl96	560	2974	A-109461.2	uGfgCfuAfgAfuGfccaUfcCfaGfaAfasGfsc	1111
AD-53752.1	A-110661.1	GfaAfgCfcAfaGfcCfcCfuUfcUfuAfcUfL96	561	3302	A-109477.2	aGfuAfaGfaAfgAfgccUfuGfgCfuUfcsAfsG	1112
AD-53753.1	A-110669.1	CfcAfgCfcCfcAfcCfcAfaGfaAfaGfcAfl96	562	3529	A-109493.2	uGfcUfuGfuUfgGfgguGfgGfgCfuGfgsUfsg	1113
AD-53754.1	A-110677.1	AfaGfcAfaGfcAfgGfaCfuUfuUfuCfuUfL96	563	3541	A-109509.2	aAfgAfuAfaAfuGfuccUfcUfuGfcUfusGfsg	1114
AD-53796.1	A-110684.1	UfcUfuUfuGfgGfuUfcUfuCfcUfcUfcUfL96	564	3558	A-109523.2	aGfaGfaGfgAfcAfgaccCfcAfaAfaGfasUfsa	1115
AD-53797.1	A-110692.1	GfuCfcUfcUfcUfgGfuGfcCfuUfuUfuAfl96	565	3570	A-109539.2	uAfaAfaAfgGfcAfacGfaGfaGfgAfcAfsG	1116
AD-53798.1	A-110700.1	UfgUfaAfcUfuGfaAfgAfuUfuUfuAfuUfL96	566	3621	A-109555.2	aAfuAfaAfuUfuCfuAfaGfuUfaCfasAfsa	1117
AD-53799.1	A-110708.1	UfuUfaCfuCfuGfcUfcUfaUfgCfcAfgAfl96	567	3056	A-109571.2	uCfuGfgCfaUfaGfagcAfgAfgUfaAfasGfsg	1118
AD-53800.1	A-110716.1	CfcAfaGfcAfaGfcAfgAfcAfuUfuAfuUfL96	568	3539	A-109587.2	aAfuAfaAfuGfuCfugcUfuGfcUfuGfgsGfsu	1119
AD-53801.1	A-110724.1	UfgGfgUfcUfgUfcCfuCfuCfuGfuUfgAfl96	569	3563	A-109603.2	uCfaAfcAfgAfgAfggacCfaGfaCfcCfasAfsa	1120
AD-53755.1	A-110638.1	GfcAfuGfgGfgAfcCfcGfuGfuCfcAfcUfL96	570	1996	A-109431.2	aGfuGfgAfcAfcGfgguCfcCfcAfuGfcsUfsg	1121
AD-53757.1	A-110654.1	UfcUfgGfaUfgGfcAfuCfuAfgCfcAfgAfl96	571	2976	A-109463.2	uCfuGfgCfuAfgAfgucCfaUfcCfaGfasAfsa	1122
AD-53758.1	A-110662.1	AfaGfcCfaAfgCfcUfcUfuCfuUfaCfuUfL96	572	3303	A-109479.2	aAfgUfaAfgAfaGfaggCfuUfgGfcUfusCfsa	1123
AD-53759.1	A-110670.1	CfcCfcAfcCfcAfaGfcAfaGfcAfgAfcAfl96	573	3533	A-109495.2	uGfuCfuGfcUfuGfuccUfgGfuGfgGfgsCfsu	1124
AD-53760.1	A-110678.1	AfgCfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfL96	574	3542	A-109511.2	aAfaGfaUfaAfaUfgucUfgCfuUfgCfusUfsg	1125

AD-53802.1	A-110685.1	UfuUfuGfgGfuCfuUfgGfuCfcUfcUfcUfgUfl96	575	3560	A-109525.2	aCfaGfaGfaGfgAfcagAfcCfcAfaAfasGfsa	1126
AD-53803.1	A-110693.1	UfuUfcUfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfl96	576	3600	A-109541.2	aAfaGfcAfaAfaCfaggUfcUfaGfaAfasAfsG	1127
AD-53804.1	A-110701.1	AfcCfaAfgGfaGfGfCfaGfgAfuUfcUfuUfl96	577	2815	A-109557.2	aAfaGfaAfuCfcUfgccUfcCfuUfgGfusGfsg	1128
AD-53805.1	A-110709.1	UfcAfgCfcAfaCfcCfcGfcUfcAfcUfaAfl96	578	3161	A-109573.2	uUfaGfuGfgAfgCfaggUfuGfgCfuGfasGfsa	1129
AD-53806.1	A-110717.1	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	579	3544	A-109589.2	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfGfsCfsu	1130
AD-53807.1	A-110725.1	GfgGfuCfuGfuCfcUfcUfcUfgUfuGfcAfl96	580	3564	A-109605.2	uGfcAfaCfaGfaGfaggAfcAfgAfcCfcsAfsa	1131
AD-53761.1	A-110639.1	CfcCfaCfaAfgCfcGfcCfuGfuGfcUfgAfl96	581	2080	A-109433.2	uCfaGfcAfcAfgCfaggCfuUfgUfgGfGfsUfsg	1132
AD-53762.1	A-110647.1	GfcUfgGfgGfcUfgAfgCfuUfuAfaAfaUfl96	582	2481	A-109449.2	aUfuUfuAfaAfgCfucaGfcCfcCfaGfcsCfsc	1133
AD-53763.1	A-110655.1	GfcUfcUfaUfgCfcAfgGfcUfgUfgCfuAfl96	583	3064	A-109465.2	uAfgCfaCfaGfcCfuggCfaUfaGfaGfcsAfsG	1134
AD-53764.1	A-110663.1	GfuGfaGfgCfuGfgGfaAfgGfgGfaAfcAfl96	584	3358	A-109481.2	uGfuUfcCfcCfuUfcccAfgCfcUfcAfcUfsg	1135
AD-53765.1	A-110671.1	CfcCfaCfcCfaAfgCfaAfgCfaGfaCfaUfl96	585	3534	A-109497.2	aUfgUfcUfgCfuUfgcuUfgGfgUfgGfGfsGfsc	1136
AD-53766.1	A-110679.1	GfcAfgAfcAfuUfuAfuCfuUfuUfgGfgUfl96	586	3547	A-109513.2	aCfcCfaAfaAfgAfuuaAfuGfcUfcUfGfcsUfsu	1137
AD-53808.1	A-110686.1	UfuUfgGfgUfcUfgUfcCfuCfuCfuGfuUfl96	587	3561	A-109527.2	aAfcAfgAfgAfgGfacaGfaCfcCfaAfasAfsG	1138
AD-53809.1	A-110694.1	UfuCfuAfgAfcCfuUfgUfuUfgCfuUfuUfl96	588	3601	A-109543.2	aAfaAfgCfaAfaAfcagGfuCfuAfgAfasAfsa	1139
AD-53810.1	A-110702.1	GfgAfgGfcAfgGfaUfuCfuUfcCfcAfuUfl96	589	2820	A-109559.2	aAfuGfgGfaAfgAfaucCfuGfcCfuCfcsUfsu	1140
AD-53811.1	A-110710.1	CfcUfgCfcAfaGfcUfcAfcAfcAfgCfaAfl96	590	3247	A-109575.2	uUfgCfuGfuGfuGfagcUfuGfgCfaGfGfsCfsa	1141
AD-53812.1	A-110718.1	AfaGfcAfgAfcAfuUfuAfuCfuUfuUfgAfl96	591	3545	A-109591.2	uCfaAfaAfgAfuAfaauGfuCfuGfcUfGfsc	1142
AD-53813.1	A-110726.1	UfcUfaGfaCfcUfgGfuUfuGfcUfuUfuUfl96	592	3602	A-109607.2	aAfaAfaGfcAfaAfaGfgUfcUfaGfasAfsa	1143
AD-53767.1	A-110640.1	GfaGfgCfcAfcGfAfgGfgUfcAfgCfcCfaAfl96	593	2099	A-109435.2	uUfgGfgCfuGfaCfcucGfuGfgCfcUfcsAfsG	1144
AD-53768.1	A-110648.1	GfgAfgGfuGfcCfaAfgGfgAfaGfcUfcCfcUfl96	594	2650	A-109451.2	aGfgGfaGfcUfuCfcugGfcAfcCfuCfcsAfsC	1145
AD-53769.1	A-110656.1	CfuCfaGfcCfaAfcCfcGfcUfcCfaCfuAfl96	595	3160	A-109467.2	uAfgUfgGfaGfcGfgguUfgGfcUfgAfgsAfsC	1146
AD-53770.1	A-110664.1	GfgCfuGfgGfaAfgGfgGfaAfcAfcAfgAfl96	596	3362	A-109483.2	uCfuGfuGfuUfcfcuUfcCfcAfgCfcsUfsc	1147

AD-53771.1	A-110672.1	CfcAfcCfcAfaGfcAfaGfcAfgAfcAfuUfL96	597	3535	A-109499.2	aAfuGfuCfuGfcUfugCfuGfgGfuGfgsGfsg	1148
AD-53772.1	A-110680.1	AfgAfcAfuUfuUfUfCfuUfuUfgGfgUfcUfL96	598	3549	A-109515.2	aGfaCfcCfaAfaAfgauAfaAfuGfuCfusGfsc	1149
AD-53814.1	A-110687.1	GfgUfcUfgUfcCfUfCfuCfuGfuUfgCfcUfL96	599	3565	A-109529.2	aGfgCfaAfcAfgAfgagGfaCfaGfaCfcsCfcsa	1150
AD-53815.1	A-110695.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	600	3603	A-109545.2	aCfaAfaAfgCfaAfaaAfgGfuCfuAfgsAfsa	1151
AD-53816.1	A-110703.1	GfaGfgCfaGfgAfuUfUfcUfuCfcCfaUfgAfl96	601	2821	A-109561.2	uCfaUfgGfgAfaGfaauCfcUfgCfcUfcsCfsu	1152
AD-53817.1	A-110711.1	CfcAfaGfcUfcAfcAfcAfgCfaGfgAfaAfl96	602	3251	A-109577.2	uUfuCfcUfgCfuGfuguGfaGfcUfuGfgsCfcsa	1153
AD-53818.1	A-110719.1	AfgCfaGfaCfaUfUfUfaUfcUfuUfuGfgAfl96	603	3546	A-109593.2	uCfcAfaAfaGfaUfaaaUfgUfcUfgCfusUfsg	1154
AD-53819.1	A-110727.1	GfuAfaCfuUfgAfaGfaUfaUfuUfaUfuUfL96	604	3622	A-109609.2	aAfaUfaAfaUfaUfcuuCfaAfgUfuAfcAfsa	1155
AD-53773.1	A-110641.1	CfaCfgAfgGfuCfaGfcCfcAfaCfaAfgUfL96	605	2104	A-109437.2	aCfuGfgUfuGfgGfcugAfcCfuCfuUfcsGfsc	1156
AD-53774.1	A-110649.1	AfcUfgUfgGfgGfcAfuUfuCfaCfcAfuUfL96	606	2676	A-109453.2	aAfuGfgUfgAfaAfgCfcCfaCfaGfusGfsa	1157
AD-53776.1	A-110665.1	GfaAfgGfgGfaAfcAfcAfgAfcCfaGfgAfl96	607	3368	A-109485.2	uCfcUfgGfuCfuGfuguUfcCfcUfuUfcsCfsc	1158
AD-53777.1	A-110673.1	CfaCfcCfaAfgCfaAfgCfaGfaCfaUfuUfL96	608	3536	A-109501.2	aAfaUfgUfcUfgCfuugCfuUfgGfgUfcsGfsg	1159
AD-53778.1	A-110681.1	AfcAfuUfuUfuCfuUfuUfgGfgUfcUfgUfL96	609	3551	A-109517.2	aCfaGfaCfcCfaAfaaAfuAfaAfuGfusCfsu	1160
AD-53820.1	A-110688.1	GfuCfuGfuCfcUfcUfcUfgUfuGfcCfuUfL96	610	3566	A-109531.2	aAfgGfcAfaCfaGfaGfgAfcAfgAfcCfsc	1161
AD-53821.1	A-110696.1	UfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfuGfuAfl96	611	3604	A-109547.2	uAfcAfaAfaGfcAfaaaCfaGfgUfcUfasGfsa	1162
AD-53822.1	A-110704.1	CfuUfuCfuGfgAfuUfgGfgCfaUfcUfaGfcAfl96	612	2973	A-109563.2	uGfcUfaGfaUfgCfcuuCfcAfgAfaAfgsCfsu	1163
AD-53823.1	A-110712.1	AfaGfcUfcAfcAfcAfgCfaGfgAfaCfuUfL96	613	3253	A-109579.2	aAfgUfuCfcUfgCfuGfuGfaGfcUfusGfsg	1164
AD-53824.1	A-110720.1	GfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuGfgGfuCfuUfL96	614	3550	A-109595.2	aAfgAfcCfcAfaAfaGfaUfaAfaUfgUfcsUfsg	1165
AD-48400.4	A-98247.3	UfuUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	615		A-93455.5	aAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgAfaAfasGfsu	1166
AD-53779.1	A-110642.1	GfgGfaGfgCfcAfcCfaUfcCfaCfcCfuUfL96	616	2137	A-109439.2	aAfgCfgUfgGfaUfgcuGfgCfcUfcCfcsUfsg	1167
AD-53780.1	A-110650.1	CfcAfcCfaAfgGfaAfgGfgCfaGfgAfuUfcUfL96	617	2813	A-109455.2	aGfaAfuCfcUfgCfcucCfuUfgGfuGfgsAfsa	1168
AD-53781.1	A-110658.1	GfcCfaAfgCfuCfaAfcCfaCfaGfcAfgGfaAfl96	618	3250	A-109471.2	uUfcCfuGfcUfgUfgugAfgCfuUfgGfcsAfsa	1169

AD-53782.1	A-110666.1	AfaGfgGfgAfaCfaCfaGfaCfaAfgGfaAfl96	619	3369	A-109487.2	uUfcCfuGfgUfcUfgugUfuCfcCfcUfusCfsc	1170
AD-53783.1	A-110674.1	AfcCfcAfaGfcAfaGfcAfaGfcAfuUfuAfl96	620	3537	A-109503.2	uAfaAfuGfuCfuGfcuuGfcUfuGfgGfusGfsg	1171
AD-53784.1	A-110682.1	UfuUfaUfcUfuUfuUfgGfgUfuCfuGfuCfcUfl96	621	3554	A-109519.2	aGfgAfaGfcAfaCfcaaAfaGfaUfaAfasUfsg	1172
AD-53825.1	A-110689.1	UfcUfgUfcCfuCfuUfcUfuUfgCfcUfuUfl96	622	3567	A-109533.2	aAfaGfgCfaAfaCfagAfgGfaCfaGfasCfsc	1173
AD-53826.1	A-110697.1	UfuUfuGfuAfaCfuUfgAfaGfaUfaUfuUfl96	623	3618	A-109549.2	aAfaUfaUfcUfuCfaagUfuAfaAfaAfasGfsc	1174
AD-53827.1	A-110705.1	UfuCfuGfgAfuGfgGfcAfuUfaGfcCfaAfl96	624	2975	A-109565.2	uUfgGfcUfaGfaUfgccAfuCfcAfaAfasAfsG	1175
AD-53828.1	A-110713.1	UfgAfaGfcCfaAfgGfcUfcUfuCfuUfaAfl96	625	3301	A-109581.2	uUfaAfaGfaGfgGfcUfuGfcUfuCfasGfsa	1176
AD-53829.1	A-110721.1	UfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfgUfcCfuUfl96	626	3555	A-109597.2	aAfgGfaCfaGfaCfccaAfaAfaAfaAfasAfsu	1177
AD-53830.1	A-110872.1	UfuUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	627		A-110873.1	aAfgCfaAfaAfaCfagguCfuAfaAfaAfasGfsu	1178
AD-53785.1	A-110643.1	AfuCfcAfaGfcUfuUfcUfcUfgCfcCfaUfl96	628	2148	A-109441.2	aUfgGfcAfgCfaGfgaaGfcGfuGfgAfasGfsc	1179
AD-53786.1	A-110651.1	CfaCfcAfaGfgAfgGfcAfgGfaUfuCfuUfl96	629	2814	A-109457.2	aAfgAfaUfcCfuGfcuuCfcUfuGfgUfgsGfsa	1180
AD-53787.1	A-110659.1	CfaAfgCfuCfaCfaCfaGfaAfgGfaAfcUfl96	630	3252	A-109473.2	aGfuUfcCfuGfcUfgugUfgAfgCfuUfgsGfsc	1181
AD-53788.1	A-110667.1	GfgGfaAfaCfaAfaGfcCfaGfgAfaGfcUfl96	631	3372	A-109489.2	aGfcUfuCfcUfgUfgcuGfuGfuUfcCfcsCfsu	1182
AD-53789.1	A-110675.1	CfcCfaAfgCfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfl96	632	3538	A-109505.2	aUfaAfaUfgUfcUfgcuUfgCfuUfgGfgsUfsg	1183
AD-53831.1	A-110690.1	CfuGfuCfuUfcUfcUfuUfgCfcCfuUfuUfl96	633	3568	A-109535.2	aAfaAfgGfcAfaCfagaGfaGfgAfcAfgsAfsC	1184
AD-53832.1	A-110698.1	UfuUfgUfaAfcUfuUfgAfaGfaUfaUfuUfl96	634	3619	A-109551.2	uAfaAfuAfuCfuUfcaaGfuUfaCfaAfasAfsG	1185
AD-53833.1	A-110706.1	CfuGfgAfuGfgCfaUfcUfaGfcCfaGfaAfl96	635	2977	A-109567.2	uUfcUfgGfcUfaGfaugCfaCfuCfcAfgsAfsa	1186
AD-53834.1	A-110714.1	AfgUfgAfgGfcUfgGfgAfaGfgGfgAfaAfl96	636	3357	A-109583.2	uUfuCfcCfcUfuCfccaGfcCfuCfaCfusGfsu	1187
AD-53835.1	A-110722.1	AfuCfuUfuUfgGfgUfcUfgUfcCfuCfuUfl96	637	3557	A-109599.2	aAfgAfgGfaCfaGfaaccCfaAfaAfgAfasAfsa	1188
AD-48399.1	A-100981.1	CfaCfuUfaCfgCfuGfaGfaAfuCfuUfl96	638		A-100982.1	uCfaAfaGfuAfuUfcAfgCfcGfuAfaUfgUfgsAfsu	1189
AD-53815.5	A-110695.11	CfuAfgAfcCfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	639	3603	A-109545.18	aCfaAfaAfgCfaAfaaccAfgGfuCfuAfgsAfsa	1190
AD-53815.4	A-110695.4	CfuAfgAfcCfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	640	3603	A-109545.5	aCfaAfaAfgCfaAfaaccAfgGfuCfuAfgsAfsa	1191

AD-56633.1	A-115520.2	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	641	3603	A-109545.6	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1192
AD-56617.1	A-115535.1	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	642	3603	A-109545.7	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1193
AD-56623.1	A-115536.1	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	643	3603	A-109545.8	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1194
AD-56629.1	A-115537.1	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	644	3603	A-109545.9	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1195
AD-56635.1	A-115538.1	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	645	3603	A-109545.10	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1196
AD-56641.1	A-115539.1	CfuagaccuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	646	3603	A-109545.11	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1197
AD-56625.1	A-115542.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	647	3603	A-109545.12	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1198
AD-56631.1	A-115543.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	648	3603	A-109545.13	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1199
AD-56637.1	A-115544.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	649	3603	A-109545.14	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1200
AD-56643.1	A-115545.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	650	3603	A-109545.15	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1201
AD-56649.1	A-115546.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	651	3603	A-109545.16	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1202
AD-56655.1	A-115547.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	652	3603	A-109545.17	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1203
AD-56615.1	A-110695.5	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	653	3603	A-115519.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1204
AD-56621.1	A-115520.1	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	654	3603	A-115519.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1205
AD-56627.1	A-115521.1	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	655	3603	A-115519.3	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1206
AD-56639.1	A-115520.3	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	656	3603	A-115522.1	ACfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1207
AD-56645.1	A-110695.6	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	657	3603	A-115522.2	ACfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1208
AD-56651.1	A-115523.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	658	3603	A-115524.1	(iA)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1209
AD-56610.1	A-115523.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	659	3603	A-115525.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1210
AD-56616.1	A-115523.3	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	660	3603	A-115526.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1211
AD-56622.1	A-115527.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	661	3603	A-115526.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1212
AD-56628.1	A-115527.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	662	3603	A-115528.1	(iA)caAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1213

AD-56634.1	A-115529.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	663	3603	A-115530.1	AbCfaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsAfsAb	1214
AD-56640.1	A-115529.2	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	664	3603	A-115531.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfuAfgsAfsAb	1215
AD-56646.1	A-115529.3	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	665	3603	A-115532.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfu CfuAfgsAfsAb	1216
AD-56652.1	A-115533.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uugUfL96	666	3603	A-115532.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfu CfuAfgsAfsAb	1217
AD-56611.1	A-115533.2	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uugUfL96	667	3603	A-115534.1	(iA)caAfaAfgcaAfaacAfgGf uCfuAfgsAfsAb	1218
AD-56647.1	A-110695.7	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfgUfL96	668	3603	A-115540.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa	1219
AD-56653.1	A-115535.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfgUfL96	669	3603	A-115540.2	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa	1220
AD-56612.1	A-115536.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuU fguL96	670	3603	A-115540.3	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa	1221
AD-56618.1	A-115537.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUf guL96	671	3603	A-115540.4	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa	1222
AD-56624.1	A-115538.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUg L96	672	3603	A-115540.5	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa	1223
AD-56630.1	A-115539.2	CfuagaccuGfUfUfuUfgcuUfuUg L96	673	3603	A-115540.6	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa	1224
AD-56636.1	A-110695.8	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfgUfL96	674	3603	A-115541.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggu CfuAfgsasa	1225
AD-56642.1	A-115535.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfgUfL96	675	3603	A-115541.2	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggu CfuAfgsasa	1226
AD-56648.1	A-115536.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuU fguL96	676	3603	A-115541.3	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggu CfuAfgsasa	1227
AD-56654.1	A-115537.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUf guL96	677	3603	A-115541.4	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggu CfuAfgsasa	1228
AD-56613.1	A-115538.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUg L96	678	3603	A-115541.5	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggu CfuAfgsasa	1229
AD-56619.1	A-115539.3	CfuagaccuGfUfUfuUfgcuUfuUg L96	679	3603	A-115541.6	aCfaaaAfgCfaAfaacAfggu CfuAfgsasa	1230
AD-56614.1	A-110695.9	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfgUfL96	680	3603	A-115548.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fUfCfuAfgsAfsa	1231
AD-56620.1	A-115542.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	681	3603	A-115548.2	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fUfCfuAfgsAfsa	1232
AD-56626.1	A-115543.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfuUfgUfL96	682	3603	A-115548.3	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fUfCfuAfgsAfsa	1233
AD-56632.1	A-115544.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfuUfgUfL96	683	3603	A-115548.4	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fUfCfuAfgsAfsa	1234
AD-56638.1	A-115545.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf UfuUfgUfL96	684	3603	A-115548.5	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fUfCfuAfgsAfsa	1235

AD-56644.1	A-115546.2	CfUfAfgGfAfcCfuGfUfUfuUfgGfCfUfUfUfUfgUfL96	685	3603	A-115548.6	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1236
AD-56650.1	A-115547.2	CfUfAfgGfAfcCfuGfUfUfuUfgGfCfUfUfUfUfgUfL96	686	3603	A-115548.7	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1237
AD-56656.1	A-110695.10	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	687	3603	A-115549.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1238
AD-56662.1	A-115542.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	688	3603	A-115549.2	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1239
AD-56668.1	A-115543.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgGfcfuUfuUfgUfL96	689	3603	A-115549.3	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1240
AD-56673.1	A-115544.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgGfcfuUfUfUfgUfL96	690	3603	A-115549.4	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1241
AD-56678.1	A-115545.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgGfcfuUfUfUfgUfL96	691	3603	A-115549.5	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1242
AD-56683.1	A-115546.3	CfUfAfgGfAfcCfuGfUfUfuUfgGfCfUfUfUfUfgUfL96	692	3603	A-115549.6	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1243
AD-56688.1	A-115547.3	CfUfAfgGfAfcCfuGfUfUfuUfgGfCfUfUfUfUfgUfL96	693	3603	A-115549.7	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1244
AD-56657.1	A-115550.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfugUfL96	694	3603	A-115551.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1245
AD-56663.1	A-115552.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuuuUfgUfL96	695	3603	A-115553.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1246
AD-56669.1	A-115554.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	696	3603	A-115555.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1247
AD-56674.1	A-115556.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuugCfuUfuUfgUfL96	697	3603	A-115557.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1248
AD-56679.1	A-115558.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	698	3603	A-115559.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1249
AD-56684.1	A-115560.1	CfuAfgacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	699	3603	A-115561.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1250
AD-56689.1	A-115535.4	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	700	3603	A-115562.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1251
AD-56693.1	A-115520.4	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	701	3603	A-115563.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1252
AD-56658.1	A-115564.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfUfgUfL96	702	3603	A-115565.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1253
AD-56664.1	A-115566.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfUfgUfL96	703	3603	A-115567.1	aCfaAfaagCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1254
AD-56670.1	A-115568.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfUfgUfL96	704	3603	A-115569.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1255
AD-56680.1	A-115572.1	CfuAfgAfcCfUfGfUfUfuUfgCfuUfuUfUfgUfL96	705	3603	A-115573.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacagGfuCfuAfgsAfsa	1256
AD-56685.1	A-115574.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfUfgUfL96	706	3603	A-115575.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsAfsa	1257

AD-56690.1	A-115542.4	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	707	3603	A-115576.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf ucuAfgsAfsa	1258
AD-56694.1	A-115577.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	708	3603	A-115578.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfuagsAfsa	1259
AD-56659.1	A-110695.12	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfu UfgUfL96	709	3603	A-115579.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfuAfgsasa	1260
AD-56665.1	A-115580.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	710	3605	A-115581.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfusAfsG	1261
AD-56671.1	A-115582.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuug UfL96	711	3605	A-115583.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfusAfsG	1262
AD-56676.1	A-115584.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuuuUfg UfL96	712	3605	A-115585.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfusAfsG	1263
AD-56681.1	A-115586.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfg UfL96	713	3605	A-115587.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfusAfsG	1264
AD-56686.1	A-115588.1	AfgAfcCfuGfUfUfuugCfuUfuUfg UfL96	714	3605	A-115589.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfusAfsG	1265
AD-56691.1	A-115590.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	715	3605	A-115591.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfusAfsG	1266
AD-56695.1	A-115592.1	AfgacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	716	3605	A-115593.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf UfCfusAfsG	1267
AD-56660.1	A-115594.1	agAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	717	3605	A-115595.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfUfsAfsG	1268
AD-56666.1	A-115596.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	718	3605	A-115597.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfu CfusAfsG	1269
AD-56672.1	A-115598.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	719	3605	A-115599.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfusAfsG	1270
AD-56677.1	A-115600.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	720	3605	A-115601.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfusAfsG	1271
AD-56682.1	A-115602.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	721	3605	A-115603.1	aCfaAfaAfgCfaaaacAfgGfu CfusAfsG	1272
AD-56687.1	A-115604.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	722	3605	A-115605.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacagGfu CfusAfsG	1273
AD-56692.1	A-115606.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	723	3605	A-115607.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfggfu CfusAfsG	1274
AD-56696.1	A-115608.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuf gUfL96	724	3605	A-115609.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf ucusAfsG	1275
AD-56661.1	A-115580.2	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	725	3605	A-115610.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfusasG	1276
AD-56667.1	A-115611.1	gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgU fL96	726	3605	A-115612.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfausa	1277
AD-53806.11	A-110717.10	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfu UfuUfL96	727	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfgsCfsu	1278
AD-53806.13	A-110717.11	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfu UfuUfL96	728	3544	A-109589.10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfgsCfsu	1279

AD-53806.12	A-110717.12	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	729	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1280
AD-53806.5	A-110717.4	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	730	3544	A-109589.5	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1281
AD-53806.6	A-110717.5	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	731	3544	A-109589.7	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1282
AD-53806.7	A-110717.6	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	732	3544	A-109589.8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1283
AD-53806.8	A-110717.7	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	733	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1284
AD-53806.9	A-110717.8	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	734	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1285
AD-53806.10	A-110717.9	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	735	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1286
AD-56979.1	A-116393.1	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	736	3544	A-109589.6	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1287
AD-56979.2	A-116393.2	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	737	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1288
AD-56975.3	A-116394.1	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	738	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1289
AD-56975.4	A-116394.2	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	739	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1290
AD-56975.5	A-116394.3	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	740	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1291
AD-56975.1	A-116394.4	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	741	3544	A-109589.5	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1292
AD-56975.2	A-116394.5	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	742	3544	A-109589.6	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1293
AD-56983.1	A-116400.1	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	743	3544	A-109589.7	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1294
AD-56983.2	A-116400.2	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	744	3544	A-109589.8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1295
AD-56983.3	A-116400.3	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	745	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1296
AD-56983.4	A-116400.4	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	746	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1297
AD-56983.5	A-116400.5	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	747	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1298
AD-56977.3	A-116406.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	748	3544	A-109589.10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1299
AD-56977.1	A-116406.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	749	3544	A-109589.11	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1300
AD-56977.2	A-116406.3	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	750	3544	A-109589.18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1301

AD-56976.1	A-116407.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	751	3544	A-109589.11	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1302
AD-56976.2	A-116407.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	752	3544	A-109589.12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1303
AD-56980.1	A-116408.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	753	3544	A-109589.12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1304
AD-56980.2	A-116408.2	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	754	3544	A-109589.13	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1305
AD-56984.1	A-116409.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	755	3544	A-109589.13	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1306
AD-56984.2	A-116409.2	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	756	3544	A-109589.14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1307
AD-56987.1	A-116410.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	757	3544	A-109589.14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1308
AD-56987.2	A-116410.2	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	758	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1309
AD-56991.1	A-116415.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucuuuuUfL96	759	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1310
AD-56993.1	A-116416.1	CfaagcagaCfAfUfuUfaucuuuuUfL96	760	3544	A-109589.16	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1311
AD-56995.1	A-116417.1	CfaagcagaCfAfUfuuaucuuuuUfL96	761	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1312
AD-56978.1	A-116418.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	762	3544	A-109589.18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1313
AD-56978.2	A-116418.2	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	763	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1314
AD-56981.1	A-116419.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	764	3544	A-109589.19	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1315
AD-56985.1	A-116420.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	765	3544	A-109589.20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1316
AD-56988.1	A-116421.1	CfaAfGfCfAfGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	766	3544	A-109589.21	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1317
AD-56988.2	A-116421.2	CfaAfGfCfAfGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	767	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1318
AD-56988.3	A-116421.3	CfaAfGfCfAfGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	768	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1319
AD-56982.1	A-116426.1	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	769	3544	A-109589.19	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1320
AD-56982.2	A-116426.2	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	770	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1321
AD-56986.1	A-116428.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	771	3544	A-109589.20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1322
AD-56986.2	A-116428.2	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfL96	772	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsgCfsu	1323

AD-56989.1	A-116430.1	CfaAfgCfaGfacAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	773	3544	A-109589.21	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1324
AD-56990.1	A-116432.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	774	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1325
AD-56992.1	A-116434.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	775	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1326
AD-56992.2	A-116434.2	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	776	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1327
AD-56994.1	A-116436.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	777	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1328
AD-56994.2	A-116436.2	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	778	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1329
AD-56996.1	A-116438.1	caagCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	779	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1330
AD-57001.1	A-116440.1	CfaAfgcagaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	780	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1331
AD-57007.1	A-116442.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	781	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1332
AD-57013.1	A-116444.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	782	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1333
AD-57019.1	A-116446.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	783	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1334
AD-57022.1	A-116448.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	784	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1335
AD-57025.1	A-116449.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	785	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1336
AD-56997.1	A-116450.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	786	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1337
AD-57002.1	A-116452.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	787	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1338
AD-57008.1	A-116453.1	CfaAfgCfaGfAfcAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	788	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1339
AD-57014.1	A-116454.1	CfaAfgCfAfgAfcAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	789	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1340
AD-57020.1	A-116455.1	CfAfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	790	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1341
AD-57020.2	A-116455.2	CfAfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	791	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1342
AD-57026.1	A-116457.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	792	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1343
AD-57003.1	A-116460.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	793	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1344
AD-57009.1	A-116462.1	CfaAfgCfaGfaCfauUfaUfcUfuUfuUfL96	794	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1345

AD-57015.1	A-116464.1	CfaAfgCfaGfacaUfuUfaUfcUfuUf uUfL96	795	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1346
AD-57023.1	A-116467.1	CfaAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	796	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1347
AD-57027.1	A-116469.1	CfaAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	797	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1348
AD-56998.1	A-116471.1	CfaAfgCfagaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	798	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1349
AD-57004.1	A-116473.1	CfaAfgcaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	799	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1350
AD-57010.1	A-116475.1	CfaagCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	800	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1351
AD-57016.1	A-116477.1	caAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	801	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1352
AD-56999.2	A-116479.1	CfaAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	802	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1353
AD-56999.1	A-116479.2	CfaAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	803	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1354
AD-57021.1	A-116481.1	CfaAfgCfAGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	804	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1355
AD-57024.1	A-116483.1	CfaAfgCfAGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	805	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1356
AD-57005.1	A-116486.1	CfaAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf uuuUfL96	806	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1357
AD-57011.1	A-116488.1	CfaAfgCfaGfaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	807	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1358
AD-57017.1	A-116490.1	CfaAfgCfagaCfAFUfuUfaUfcUfUf UfuUfL96	808	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1359
AD-57000.2	A-116492.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf aUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	809	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1360
AD-57000.3	A-116492.2	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf aUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	810	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1361
AD-57000.1	A-116492.3	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf aUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	811	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1362
AD-57006.2	A-116494.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf (Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo) UfL96	812	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1363
AD-57006.3	A-116494.2	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf (Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo) UfL96	813	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1364
AD-57006.1	A-116494.3	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf (Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo) UfL96	814	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfsgCfsu	1365
AD-57012.1	A-116498.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFUfuUf	815	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU	1366

		aUfcUf(Teo)Uf(Teo)Ubl96				fgCfuUfgsCfsu	
AD-57018.1	A-116500.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUf (Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo) Ubl96	816	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcU fgCfuUfgsCfsu	1367
AD-53815.1		CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUf uUfgUfl96	817	3601		aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfuAfgsAfsa	1368
AD-57928.40		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu UfuUfgUfl96	818	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1369
AD-59182.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu uugul96	819	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1370
AD-59184.3		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu ugul96	820	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1371
AD-59186.3		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu ugul96	821	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1372
AD-59171.13		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu gul96	822	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1373
AD-59176.7		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu ul96	823	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1374
AD-59170.7		CfsusagacCfuGfuUfuUfgCfu ul96	824	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1375
AD-59175.7		CfsusagacCfuGfuUfuUfgCfu L96	825	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1376
AD-59179.7		csusagacCfuGfuUfuUfgCfu 96	826	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1377
AD-59218.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu gul96	827	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1378
AD-59222.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu ul96	828	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfg GfuCfuAfgsasa	1379
AD-59226.1		CfsusagacCfuGfuUfuUfgCfu ul96	829	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1380
AD-59230.1		CfsusagacCfuGfuUfuUfgCfu L96	830	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1381
AD-59235.1		csusagacCfuGfuUfuUfgCfu 96	831	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1382
AD-59207.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu gul96	832	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1383
AD-59211.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfu ul96	833	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1384
AD-59215.1		CfsusagacCfuGfuUfuUfgCfu ul96	834	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1385
AD-59219.1		CfsusagacCfuGfuUfuUfgCfu L96	835	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1386
AD-59223.1		csusagacCfuGfuUfuUfgCfu 96	836	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfc AfgGfuCfuAfgsasa	1387

AD-59181.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	837	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1388
AD-59172.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	838	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1389
AD-59177.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfL96	839	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1390
AD-59180.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	840	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1391
AD-59183.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfsL96	841	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1392
AD-59185.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfsL96	842	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1393
AD-59173.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuuugsuL96	843	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1394
AD-59232.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	844	3600		PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1395
AD-59236.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	845	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1396
AD-59216.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	846	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1397
AD-59220.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	847	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1398
AD-59224.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfL96	848	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1399
AD-59228.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	849	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1400
AD-59233.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfsL96	850	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1401
AD-59237.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfsL96	851	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1402
AD-59209.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuuugsuL96	852	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1403
AD-59208.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	853	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1404
AD-59212.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	854	3600		PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1405
AD-59210.1		csusAGAccuGuuuuGcuuuuGuL96	855	3601		AscsAAAAGcAAAACAGGucuAGsasa	1406
AD-59214.1		AsGsAccuGuuuuGcuuuuGuL96	856	3603		AscsAAAAGcAAAACAGGucusAsG	1407
AD-59227.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuuGfuL96	857	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1408
AD-59231.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuuGfuL96	858	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1409

AD-59198.3	(C3m)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	859	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1410
AD-59200.3	(C3m)(U3m)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	860	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1411
AD-59203.3	(m5Cam)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	861	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1412
AD-59204.3	(m5Cam)(Tam)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	862	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1413
AD-59188.3	(m5Cams)(Tams)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	863	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1414
AD-59191.3	(m5Cams)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	864	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1415
AD-59213.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	865	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1416
AD-59217.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	866	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3m)(A3m)a	1417
AD-59221.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	867	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aam)a	1418
AD-59225.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	868	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(Gam)(Aam)a	1419
AD-59229.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	869	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aams)a	1420
AD-59234.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	870	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(Gams)(Aams)a	1421
AD-59238.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	871	3601		(A3m)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1422
AD-59241.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	872	3601		as(C3m)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1423
AD-59245.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	873	3601		(Aam)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1424
AD-59250.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	874	3601		as(m5Cam)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1425
AD-59246.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	875	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1426
AD-59253.2	usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	876	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1427
AD-59242.1	AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	877	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1428
AD-59253.1	usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	878	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1429
AD-59258.1	usasgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	879	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1430
AD-59251.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	880	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1431

		UfuUfgUfL96				gGfuCfusAfsG	
AD-59256.1		usAfsGafcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	881	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfusAf	1432
AD-59260.1		AfsGsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	882	3605		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfusCfsu	1433
AD-59248.1		gsAfsCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	883	3605		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfusCfsu	1434
AD-59247.1		gsAfsCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	884	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfsusa	1435
AD-59252.1		AfsGsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	885	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfsusa	1436
AD-59257.1		usAfsGafcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	886	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfsusa	1437
AD-59261.1		AfsGsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	887	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfusAsG	1438
AD-59262.1		usAfsGafcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	888	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfusAsG	1439
AD-59265.1		csusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	889	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfusAsG	1440
AD-59196.13		usAfsGafcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	890	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1441
AD-59189.11		AfsGsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	891	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf	1442
		UfgUfL96				gGfuCfuAfgsasa	
AD-59190.3		usCfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	892	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1443
AD-59192.3		UfsusCfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	893	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1444
AD-59240.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	894	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf fgGfuCfuAfgs(A3m)a	1445
AD-59244.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	895	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf fgGfuCfuAfgsasa	1446
AD-59202.7		(C3m)usagaccuguuuuugcuuuugL96	896	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1447
AD-59195.5		(C3m)usAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	897	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1448
AD-59249.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	898	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgs(A3m)a	1449
AD-59254.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	899	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgs(A3m)a	1450
AD-59259.1		(C3m)usAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	900	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgs(A3m)a	1451
AD-59264.1		(C3m)usagaccuguuuuugcuuuugL96	901	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgs(A3m)a	1452
AD-59264.2		(C3m)usagaccuguuuuugcuuuugL96	902	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf	1453

		uL96				gGfuCfuAfgs(A3m)a	
AD-59255.1		CsusagaccuGfUfUfuugcuuuugu L96	903	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgs(A3m)a	1454
AD-57928.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfu UfuUfgUfL96	904	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1455
AD-58893.1		CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	905	3601		asCfaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgasa	1456
AD-58894.1		CfusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	906	3601		aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsaa	1457
AD-58895.1		CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUf uUfgUfL96	907	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAf gGfuCfuAfgsasa	1458
AD-58896.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfu UfuUfgUfL96	908	3601		aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfuAfgaa	1459
AD-58897.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfu UfuUfgUfL96	909	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacA fgGfuCfuAfgsasa	1460
AD-58898.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfu UfuUfgUfL96	910	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacA fsgGfuCfuAfgsasa	1461
AD-58899.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfu UfuUfgUfL96	911	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacA fsgGfuCfuAfgsasa	1462
AD-58900.1		CfsasAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfc UfuUfuUfL96	912	NA		asAfsaAfaGfaUfaAfaugUf cUfgCfuUfgscsu	1463
AD-58902.1		UfsusUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfu	913	3597		asAfgCfaAfaAfcAfgguCf	1464
		UfgCfuUfL96				uAfgAfaAfasgsu	
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUf gCfuUfuUfgUfL96	914			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfusasg	1465
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUf gCfuUfuUfgUfL96	915			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfusasg	1466
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUf gCfuUfuUfgUfL96	916			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfu(A3mx)g	1467
		(A3mx)gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	917			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfusasg	1468
		(A3mx)gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	918			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfusasg	1469
		(A3mx)gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	919			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfu(A3mx)g	1470
		(C3mx)(U3mx)AfgAfcCfuGfUfUf uUfgCfuUfuUfgUfL96	920			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1471
		(C3mx)(U3mx)AfgAfcCfuGfUfUf uUfgCfuUfuUfgUfL96	921			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfg(A3mx)(A3 mx)a	1472
		(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCf uUfuUfgUfL96	922			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1473
		(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCf uUfuUfgUfL96	923			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1474

	(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	924		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx)a	1475
	(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	925		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx)(A3mx)a	1476
	(C3mx)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	926		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1477
	(Chd)susAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	927		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1478
	(phe)CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	928		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1479
	(phe)CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	929		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1480
	(pshe)CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	930		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1481
	(pshe)CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	931		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1482
	AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	932		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1483
	AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	933		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A3mx)g	1484
	Cfs(Uhd)sAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	934		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1485
	CfsusAfgAf(Chd)CfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	935		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1486
	CfsusAfgAfc(Chd)uGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	936		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1487
	CfsusAfgAfcCf(Uhd)GfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	937		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1488
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	938		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1489
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	939		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1490
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	940		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1491
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	941		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1492
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	942		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1493
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	943		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1494
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	944		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1495
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	945		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1496

		f(Tgn)UfgUfl96				GfuCfuAfgsasa	
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU f(Uhd)UfgUfl96	946			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1497
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fu(Tgn)gUfl96	947			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1498
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fu(Uhd)gUfl96	948			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1499
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUf(Ggn)Ufl96	949			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1500
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfg(Tgn)L96	950			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1501
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfg(Uhd)L96	951			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1502
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	952			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa	1503
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	953			(Agn)CfsaAfaAfgCfaAfaac AfgGfuCfuAfgsasa	1504
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	954			(Agn)CfaAfaAfgCfaAfaacA fgGfuCfuAfgsasa	1505
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	955			P(Agn)CfaAfaAfgCfaAfaac AfgGfuCfuAfgsasa	1506
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU	956			as(Cgn)aAfaAfgCfaAfaacA	1507
		fuUfgUfl96				fgGfuCfuAfgsasa	
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	957			asCfs(Agn)AfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1508
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	958			asCfsa(Agn)aAfgCfaAfaac AfgGfuCfuAfgsasa	1509
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	959			asCfsaAf(Agn)AfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1510
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	960			asCfsaAfa(Agn)gCfaAfaac AfgGfuCfuAfgsasa	1511
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	961			asCfsaAfaAf(Ggn)CfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1512
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	962			asCfsaAfaAfg(Cgn)aAfaac AfgGfuCfuAfgsasa	1513
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	963			asCfsaAfaAfgCf(Agn)Afaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1514
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	964			asCfsaAfaAfgCfa(Agn)aac AfgGfuCfuAfgsasa	1515
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	965			asCfsaAfaAfgCfaAf(Agn)a cAfgGfuCfuAfgsasa	1516
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfl96	966			asCfsaAfaAfgCfaAfa(Agn) cAfgGfuCfuAfgsasa	1517
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU	967			asCfsaAfaAfgCfaAfaa(Cgn)	1518

		fuUfgUfL96)AfgGfuCfuAfgsasa	
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	968			asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiG fuCfuAfisasa	1519
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	969			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfg(A3mx)a	1520
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	970			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgs(A3mx)a	1521
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	971			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfi(G3mx)(A3mx)a	1522
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	972			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1523
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	973			(A3mx)CfsaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1524
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	974			P(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfa acAfgGfuCfuAfgsasa	1525
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	975			a(C3mx)aAfaAfgCfaAfaac AfgGfuCfuAfgsasa	1526
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	976			as(C3mx)aAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgsasa	1527
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	977			(A3mx)(C3mx)aAfaAfgCfa AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1528
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU	978			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa	1529
		fuUfgUfL96				cAfgGfuCfuAfg(A3mx)a	
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	979			(A3mx)CfsaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfgs(A3mx)a	1530
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	980			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaa cAfgGfuCfuAfi(G3mx)(A3 mx)a	1531
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	981			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsas(phe)	1532
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	982			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgaas(phe)	1533
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	983			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgaaf(phe)	1534
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	984			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsas(phe)	1535
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	985			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgas(phe)	1536
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	986			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfga(phe)	1537
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	987			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg Gfi(Uhd)CfuAfgsasa	1538
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuU fuUfgUfL96	988			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfi(Uhd)Afgsasa	1539

	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	989		asCfsaAfaAfg(Chd)aAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1540
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	990		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1541
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	991		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1542
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	992		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1543
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuugUfL96	993		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1544
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuugUfL96	994		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1545
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuuguL96	995		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1546
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgCfuUfuuguL96	996		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1547
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgcuuuugUfL96	997		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1548
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgcuuuugUfL96	998		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1549
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgcuuuugL96	999		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1550
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgcuuuugL96	1000		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1551
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfgUfUfuUfgUfL96	1001		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1552
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1002		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1553
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1003		asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1554
	CfsusAfgAfcCfuGFUFUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1004		asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiGfuCfuAfisasa	1555
	CfsusAfiAfcCfuGFUFUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1005		asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiGfuCfuAfisasa	1556

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

Подгруппу этих дуплексов оценивали на эффективность в анализах со свободным поглощением разовой дозы гепатоцитами макаков-крабоедов. Вкратце, первичные гепатоциты макаков-крабоедов (PCH) обрабатывали конъюгированными модифицированными дуплексами siRNA при трех концентрациях, 500 нМ, 100 нМ и 10 нМ. Анализы со свободным поглощением с концентрациями 100 нМ и 10 нМ выполняли дважды и данные представляли как оставшееся среднее количество транскрипта по отношению к контролю +/- среднее квадратичное отклонение (SD). Тест с 500 нМ выполняли один раз. В табл. 3 показаны результаты этих анализов.

Тест на эффективность в отношении PCSK9 при помощи свободного поглощения первичными гепатоцитами макаков-крабоедов

ID дуплекса	PCN, 500 нМ	PCN, 100 нМ, средн.	PCN, 10 нМ, средн.	PCN, 100 нМ, SD	PCN, 10 нМ, SD
AD-48399	1,08	1,03	0,98	0,09	0,02
AD-48399	0,97	0,95	1,10	0,03	0,09
AD-48399	0,89	0,98	1,02	0,06	0,06
AD-48399	1,04	1,00	1,01	0,02	0,08
AD-48399	0,92	1,03	0,96	0,02	0,09
AD-48399	1,13	1,03	0,96	0,05	0,01
AD-48400	0,48	0,63	0,90	0,04	0,00
AD-48400.4	0,65	0,78	0,89	0,14	0,13
AD-53649.1	0,96	0,96	1,14	0,02	0,07
AD-53650.1	0,97	0,92	1,15	0,01	0,06
AD-53651.1	1,02	0,98	1,15	0,13	0,10
AD-53652.1	0,83	0,89	1,14	0,20	0,05
AD-53653.1	0,85	0,95	1,26	0,04	0,07
AD-53654.1	0,84	0,93	1,19	0,02	0,13
AD-53656.1	0,92	0,92	1,07	0,05	0,03
AD-53657.1	0,92	0,89	1,02	0,05	0,03
AD-53658.1	0,89	0,83	0,97	0,04	0,14
AD-53659.1	0,79	0,82	1,05	0,06	0,13
AD-53660.1	0,89	0,86	0,98	0,07	0,07
AD-53661.1	0,92	1,03	1,07	0,02	0,04
AD-53663.1	0,88	0,90	1,08	0,03	0,02

046901

AD-53664.1	0,95	0,86	1,00	0,09	0,13
AD-53665.1	0,92	0,91	1,05	0,01	0,13
AD-53666.1	0,73	0,80	0,95	0,08	0,02
AD-53667.1	0,95	0,96	1,12	0,06	0,03
AD-53668.1	1,03	0,89	1,17	0,03	0,12
AD-53669.1	1,12	0,90	1,05	0,01	0,15
AD-53670.1	0,85	0,88	1,00	0,06	0,06
AD-53671.1	0,87	0,90	0,93	0,02	0,04
AD-53672.1	0,87	0,86	0,95	0,04	0,16
AD-53674.1	0,69	0,75	0,92	0,08	0,02
AD-53675.1	0,99	0,92	1,17	0,11	0,06
AD-53676.1	0,90	0,87	1,10	0,03	0,08
AD-53677.1	1,22	0,86	1,12	0,10	0,04
AD-53678.1	1,01	0,98	1,03	0,03	0,12
AD-53679.1	0,96	0,85	1,02	0,04	0,11
AD-53680.1	1,21	0,94	0,99	0,03	0,01
AD-53681.1	1,02	0,94	1,01	0,01	0,11
AD-53682.1	0,98	0,90	1,01	0,06	0,11
AD-53683.1	0,95	0,90	1,01	0,02	0,08
AD-53684.1	1,14	1,01	1,01	0,09	0,07
AD-53685.1	0,96	0,92	1,03	0,00	0,07
AD-53687.1	1,31	0,91	1,02	0,02	0,11
AD-53688.1	0,90	0,95	0,96	0,03	0,03
AD-53689.1	0,97	0,95	1,05	0,04	0,07
AD-53690.1	0,82	0,97	0,99	0,13	0,08
AD-53691.1	0,99	1,01	0,97	0,01	0,12
AD-53692.1	1,11	0,91	1,00	0,04	0,03
AD-53693.1	1,02	0,96	1,02	0,04	0,10
AD-53694.1	1,12	0,98	0,97	0,07	0,06
AD-53695.1	0,97	1,04	0,94	0,11	0,08
AD-53696.1	0,85	0,91	1,23	0,10	0,01
AD-53697.1	0,89	0,91	1,06	0,03	0,00
AD-53698.1	0,90	0,86	1,15	0,06	0,01
AD-53699.1	0,84	0,85	1,07	0,00	0,03
AD-53700.1	0,93	1,02	1,21	0,02	0,15

046901

AD-53701.1	1,01	0,96	1,12	0,00	0,17
AD-53702.1	0,95	0,94	1,06	0,05	0,15
AD-53703.1	0,82	0,85	1,04	0,07	0,13
AD-53704.1	0,92	0,97	0,94	0,04	0,02
AD-53705.1	0,96	0,98	1,00	0,11	0,15
AD-53706.1	0,90	0,97	1,03	0,01	0,20
AD-53707.1	0,86	0,98	1,11	0,14	0,24
AD-53708.1	1,10	0,94	1,05	0,02	0,15
AD-53709.1	0,79	0,84	1,08	0,01	0,18
AD-53710.1	1,03	0,91	1,06	0,01	0,09
AD-53711.1	0,90	0,90	0,99	0,00	0,28
AD-53712.1	0,97	0,92	0,97	0,00	0,12
AD-53713.1	0,98	0,93	1,07	0,01	0,16
AD-53714.1	1,09	0,86	0,99	0,03	0,09
AD-53715.1	1,04	0,83	0,94	0,06	0,06
AD-53716.1	0,82	0,85	1,02	0,05	0,14
AD-53717.1	0,98	0,94	0,98	0,11	0,12
AD-53718.1	0,89	1,04	1,01	0,18	0,01
AD-53719.1	0,98	1,05	1,05	0,06	0,17
AD-53720.1	1,02	0,88	1,08	0,01	0,15
AD-53721.1	0,88	0,95	1,03	0,07	0,11
AD-53722.1	0,98	0,95	1,01	0,06	0,12
AD-53723.1	0,89	0,89	1,02	0,10	0,06
AD-53724.1	0,98	0,93	1,00	0,13	0,01
AD-53725.1	1,04	1,05	1,09	0,19	0,11
AD-53726.1	0,87	0,88	0,88	0,00	0,02
AD-53727.1	0,82	0,92	1,02	0,05	0,13
AD-53728.1	0,86	0,93	1,06	0,03	0,08
AD-53729.1	0,86	0,81	1,02	0,12	0,03
AD-53730.1	1,01	0,95	1,02	0,07	0,01
AD-53731.1	0,99	0,98	1,00	0,08	0,07
AD-53732.1	0,93	0,86	1,01	0,12	0,11
AD-53733.1	1,06	1,02	1,08	0,05	0,06
AD-53734.1	0,95	0,93	1,04	0,12	0,05
AD-53735.1	1,00	0,93	1,01	0,02	0,06

046901

AD-53736.1	0,90	1,09	1,16	0,05	0,01
AD-53737.1	0,94	0,93	1,00	0,02	0,09
AD-53738.1	0,93	0,79	0,93	0,03	0,01
AD-53739.1	1,11	0,90	0,90	0,05	0,00
AD-53740.1	0,86	0,92	0,97	0,08	0,01
AD-53741.1	0,96	0,84	0,92	0,00	0,07
AD-53742.1	1,03	0,93	1,03	0,04	0,06
AD-53743.1	0,92	0,98	1,05	0,08	0,14
AD-53744.1	0,95	1,02	1,03	0,08	0,12
AD-53745.1	0,81	0,99	1,11	0,10	0,18
AD-53746.1	0,65	0,83	1,04	0,07	0,16
AD-53747.1	0,82	0,88	1,02	0,05	0,13
AD-53748.1	0,46	0,59	0,72	0,06	0,07
AD-53749.1	0,93	0,90	1,04	0,12	0,16
AD-53750.1	0,90	1,02	0,97	0,02	0,10
AD-53751.1	0,92	0,87	1,02	0,19	0,16
AD-53752.1	0,73	0,88	0,99	0,06	0,18
AD-53753.1	0,87	0,97	1,06	0,07	0,19
AD-53754.1	0,43	0,58	0,72	0,10	0,05
AD-53755.1	1,01	0,99	1,03	0,03	0,02
AD-53757.1	0,98	0,91	1,07	0,05	0,13
AD-53758.1	0,63	0,73	0,92	0,05	0,00
AD-53759.1	0,91	0,92	0,99	0,02	0,08
AD-53760.1	0,51	0,67	0,80	0,03	0,12
AD-53761.1	0,89	1,07	1,10	0,11	0,18
AD-53762.1	1,06	1,00	0,96	0,12	0,10
AD-53763.1	0,95	1,10	1,00	0,07	0,09
AD-53764.1	0,99	0,94	0,99	0,05	0,16
AD-53765.1	0,92	0,87	0,86	0,09	0,11
AD-53766.1	0,75	0,78	0,86	0,09	0,14
AD-53767.1	1,01	1,02	0,97	0,05	0,18
AD-53768.1	0,89	1,07	0,97	0,09	0,15
AD-53769.1	0,89	1,11	0,95	0,05	0,11
AD-53770.1	0,76	1,01	0,98	0,01	0,12
AD-53771.1	0,70	0,74	0,84	0,06	0,12

046901

AD-53772.1	0,72	0,83	0,85	0,04	0,11
AD-53773.1	0,96	1,00	0,98	0,05	0,07
AD-53774.1	0,75	0,92	1,01	0,06	0,14
AD-53776.1	0,78	0,94	0,97	0,11	0,08
AD-53777.1	0,67	0,68	0,74	0,11	0,01
AD-53778.1	0,74	0,73	0,92	0,13	0,14
AD-53779.1	1,00	0,98	0,95	0,14	0,04
AD-53780.1	0,90	0,92	0,98	0,12	0,05
AD-53781.1	0,84	0,95	1,00	0,17	0,06
AD-53782.1	0,87	0,92	0,90	0,11	0,02
AD-53783.1	0,71	0,79	0,78	0,14	0,03
AD-53784.1	0,68	0,82	0,86	0,10	0,10
AD-53785.1	1,10	0,96	0,96	0,09	0,07
AD-53786.1	0,98	0,89	0,95	0,20	0,14
AD-53787.1	1,23	0,93	1,00	0,11	0,21
AD-53788.1	0,95	0,90	0,94	0,17	0,08
AD-53789.1	0,55	0,60	0,78	0,09	0,08
AD-53790.1	0,70	0,91	1,04	0,08	0,16
AD-53791.1	0,47	0,67	0,92	0,12	0,09
AD-53792.1	0,52	0,75	0,89	0,06	0,04
AD-53793.1	0,88	1,03	1,07	0,20	0,09
AD-53794.1	0,85	1,00	1,09	0,17	0,22
AD-53795.1	0,58	0,71	1,00	0,10	0,12
AD-53796.1	0,62	0,78	0,96	0,07	0,12
AD-53797.1	0,72	0,78	0,93	0,12	0,10
AD-53798.1	0,50	0,55	0,76	0,08	0,03
AD-53799.1	0,98	0,92	1,10	0,11	0,21
AD-53800.1	0,59	0,65	0,87	0,15	0,14
AD-53801.1	0,81	0,84	1,05	0,14	0,18
AD-53802.1	0,68	0,79	1,03	0,13	0,13
AD-53803.1	0,51	0,53	0,77	0,09	0,05
AD-53804.1	0,94	0,86	1,05	0,15	0,15
AD-53805.1	0,95	0,93	1,03	0,12	0,19
AD-53806.1	0,38	0,45	0,78	0,05	0,12
AD-53807.1	0,85	0,95	1,15	0,09	0,24

AD-53808.1	0,81	0,85	0,93	0,08	0,11
AD-53809.1	0,50	0,62	0,77	0,00	0,12
AD-53810.1	0,84	0,82	0,98	0,16	0,22
AD-53811.1	0,94	0,95	1,00	0,10	0,11
AD-53812.1	0,61	0,76	0,97	0,14	0,22
AD-53813.1	0,67	0,76	0,94	0,01	0,15
AD-53814.1	0,58	0,67	0,84	0,11	0,19
AD-53815.1	0,49	0,50	0,72	0,09	0,17
AD-53816.1	0,82	0,91	0,93	0,08	0,10
AD-53817.1	0,92	0,94	1,07	0,13	0,36
AD-53818.1	0,83	0,99	0,99	0,07	0,41
AD-53819.1	0,61	0,75	0,88	0,24	0,16
AD-53820.1	0,71	0,81	0,92	0,17	0,04
AD-53821.1	0,56	0,54	0,68	0,13	0,05
AD-53822.1	1,24	0,88	1,05	0,12	0,17
AD-53823.1	1,03	0,86	0,99	0,11	0,18
AD-53824.1	0,76	0,73	0,93	0,16	0,11
AD-53825.1	0,57	0,63	0,82	0,18	0,04
AD-53826.1	0,54	0,51	0,78	0,08	0,07
AD-53827.1	0,99	0,91	1,05	0,12	0,08
AD-53828.1	0,69	0,77	0,87	0,09	0,16
AD-53829.1	0,72	0,91	0,95	0,11	0,16
AD-53830.1	0,48	0,73	0,76	0,11	0,01
AD-53831.1	0,97	0,92	1,00	0,22	0,25
AD-53832.1	0,68	0,63	0,81	0,15	0,02
AD-53833.1	0,92	0,90	0,84	0,20	0,03
AD-53834.1	1,15	0,93	0,86	0,16	0,02
AD-53835.1	0,88	0,79	0,81	0,18	0,03
PBS	0,90	1,02	0,99	0,04	0,15

Модифицированные и конъюгированные дуплексы siRNA к PCSK9 также оценивали на эффективность с помощью анализов с трансфекцией на трех клеточных линиях человека. siRNA к PCSK9 трансфицировали три различные клеточные линии, HeLa, Hep3В и HepG2, в двух дозах, 10 нМ и 0,1 нМ. Результаты этих анализов показаны в табл. 4, и данные выражены как доля оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю.

На фиг. 1 показано, что существует общая воспроизводимость активности в отношении сайленсинга дуплексов к PCSK9 между анализами со свободным поглощением и анализами с трансфекцией.

Значения IC_{50} для выбранных дуплексов при свободном поглощении клетками яванского макака и при трансфекции клеток Hep3В показаны в табл. 5.

Таблица 4

Тест на эффективность в отношении PCSK9 при помощи трансфекции клеточных линий человека

ID дуплекса	Hela, 10 нМ	Hela, 0,1 нМ	Нер3b, 10 нМ	Нер3b, 0,1 нМ	НерG2, 10 нМ	НерG2, 0,1 нМ
AD-48399	0,94	0,90	1,18	1,03	1,34	1,05
AD-48399	0,90	1,03	0,87	0,88	0,84	0,91
AD-48399	0,88	1,14	0,90	0,99	0,92	1,04
AD-48399	1,22	0,97	0,95	0,98	0,81	0,92
AD-48399	1,04	0,81	1,01	1,10	1,03	1,09
AD-48399	1,06	1,20	1,14	1,04	1,16	1,01
AD-48400	0,05	0,63	0,10	0,51	0,17	0,69
AD-48400,4	0,06	0,28	0,14	0,31	0,13	0,32
AD-53649,1	0,84	1,05	1,07	0,94	0,97	1,11
AD-53650,1	0,16	0,87	0,41	0,87	0,52	1,12
AD-53651,1	0,47	0,86	0,49	0,92	0,71	1,08
AD-53652,1	0,34	0,93	0,50	0,96	0,40	1,21
AD-53653,1	0,36	0,99	0,43	1,01	0,52	1,13
AD-53654,1	0,85	1,06	0,99	0,92	0,95	1,06
AD-53656,1	0,46	0,92	0,78	0,98	0,80	0,74
AD-53657,1	0,71	0,97	0,75	1,01	0,81	0,94
AD-53658,1	0,32	0,97	0,50	0,91	0,58	1,05
AD-53659,1	0,11	0,86	0,24	0,93	0,22	0,94
AD-53660,1	0,35	1,12	0,43	0,99	0,44	1,31
AD-53661,1	0,94	1,07	0,85	0,95	0,88	0,92
AD-53663,1	0,82	1,03	0,74	1,06	1,04	1,04
AD-53664,1	0,60	0,94	0,61	1,06	0,85	1,28
AD-53665,1	0,33	1,00	0,55	1,01	0,45	1,12

046901

AD-53666,1	0,09	0,98	0,22	0,97	0,21	1,08
AD-53667,1	0,94	1,07	0,95	0,96	0,95	1,02
AD-53668,1	0,27	0,88	0,36	1,07	0,35	1,13
AD-53669,1	0,81	1,02	0,93	1,08	1,35	1,24
AD-53670,1	0,55	0,94	0,52	0,48	0,45	1,13
AD-53671,1	0,68	1,07	0,78	1,02	0,82	1,27
AD-53672,1	0,22	1,04	0,38	1,06	0,34	1,15
AD-53674,1	0,08	0,67	0,15	0,85	0,15	0,80
AD-53675,1	0,25	1,04	0,43	0,95	0,38	1,04
AD-53676,1	0,81	0,94	0,90	1,14	0,98	1,06
AD-53677,1	0,45	0,90	0,70	0,98	0,70	1,14
AD-53678,1	0,41	1,02	0,72	1,04	0,70	1,15
AD-53679,1	0,44	0,93	0,58	0,88	0,50	0,95
AD-53680,1	0,36	0,99	0,55	0,98	0,52	0,96
AD-53681,1	0,33	0,93	0,57	1,12	0,54	1,11
AD-53682,1	0,84	0,94	0,85	1,06	0,93	1,13
AD-53683,1	0,65	0,78	0,95	1,05	0,73	1,06
AD-53684,1	0,57	0,98	0,79	0,92	0,62	1,08
AD-53685,1	0,85	0,90	0,94	0,95	0,69	0,98
AD-53687,1	0,15	0,83	0,39	1,09	0,34	1,23
AD-53688,1	0,45	0,89	0,72	1,01	0,57	1,19
AD-53689,1	0,56	0,93	1,04	1,14	0,59	1,24
AD-53690,1	0,45	0,79	0,53	1,26	0,41	1,22
AD-53691,1	0,82	1,03	0,91	1,22	0,57	1,05
AD-53692,1	0,68	0,81	0,81	0,89	0,82	1,05
AD-53693,1	0,61	0,92	0,85	0,81	0,53	1,03
AD-53694,1	0,59	0,87	0,58	1,01	0,53	0,82
AD-53695,1	0,91	0,78	1,02	1,23	1,14	1,11
AD-53696,1	0,57	0,98	0,82	1,01	0,68	1,05
AD-53697,1	0,31	1,04	0,40	0,95	0,24	0,90
AD-53698,1	0,17	0,97	0,31	0,92	0,32	0,84
AD-53699,1	0,29	1,00	0,47	0,90	0,47	1,23
AD-53700,1	0,81	1,07	0,94	0,99	0,97	1,08
AD-53701,1	0,89	1,07	0,96	0,84	0,65	0,93
AD-53702,1	0,45	1,03	0,84	1,08	0,72	0,99

046901

AD-53703,1	0,18	0,79	0,28	0,97	0,29	0,90
AD-53704,1	0,77	0,80	0,88	1,06	0,91	0,95
AD-53705,1	0,63	0,89	0,81	1,06	0,76	0,97
AD-53706,1	0,39	0,82	0,41	1,00	0,48	0,88
AD-53707,1	0,42	0,97	0,60	0,83	0,54	0,80
AD-53708,1	0,49	0,95	0,82	0,96	1,07	1,09
AD-53709,1	0,19	0,90	0,43	0,85	0,38	1,05
AD-53710,1	0,66	1,00	0,82	0,85	0,69	1,08
AD-53711,1	0,40	0,90	0,45	0,95	0,23	1,03
AD-53712,1	0,47	0,99	0,51	0,94	0,62	0,97
AD-53713,1	0,52	1,05	0,69	0,83	0,79	0,94
AD-53714,1	0,43	1,01	0,71	1,11	0,75	1,12
AD-53715,1	0,23	0,99	0,58	1,24	0,58	1,09
AD-53716,1	0,39	1,00	0,52	0,98	0,51	0,80
AD-53717,1	0,20	0,84	0,33	1,02	0,41	1,09
AD-53718,1	0,35	1,08	0,33	1,02	0,45	0,97
AD-53719,1	0,58	0,96	0,74	0,84	0,79	1,01
AD-53720,1	0,31	1,00	0,55	1,09	0,48	1,24
AD-53721,1	0,26	1,02	0,62	0,92	0,49	0,94
AD-53722,1	0,50	0,99	0,86	0,99	0,87	1,26
AD-53723,1	0,28	0,86	0,37	0,92	0,54	1,11
AD-53724,1	0,18	1,11	0,20	0,98	0,36	1,05
AD-53725,1	0,47	1,00	0,63	0,95	0,60	1,04
AD-53726,1	0,19	1,01	0,42	0,96	0,41	1,21
AD-53727,1	0,55	0,82	0,77	1,08	0,68	1,35
AD-53728,1	0,44	0,92	0,65	1,11	0,68	1,44
AD-53729,1	0,11	0,92	0,25	0,94	0,11	1,01
AD-53730,1	0,31	0,91	0,51	1,05	0,59	1,34
AD-53731,1	0,26	0,63	0,42	0,95	0,44	1,07
AD-53732,1	0,17	0,87	0,29	0,99	0,36	0,98
AD-53733,1	1,06	0,72	1,21	1,14	1,07	1,28
AD-53734,1	0,79	0,92	0,93	0,98	0,90	1,33
AD-53735,1	0,54	0,87	0,83	1,12	0,66	1,24
AD-53736,1	0,40	0,69	0,76	1,09	0,76	1,11
AD-53737,1	0,29	0,82	0,41	1,04	0,39	0,96

046901

AD-53738,1	0,19	0,70	0,24	1,09	0,28	1,10
AD-53739,1	0,91	0,94	0,72	1,07	0,78	1,09
AD-53740,1	0,17	1,06	0,42	1,07	0,32	1,05
AD-53741,1	0,17	0,91	0,32	0,99	0,41	1,05
AD-53742,1	0,55	1,07	0,69	0,97	0,72	1,08
AD-53743,1	0,71	0,99	0,75	0,76	0,58	1,08
AD-53744,1	0,13	0,86	0,50	0,69	0,36	0,87
AD-53745,1	0,46	0,91	0,78	0,72	0,87	0,94
AD-53746,1	0,13	0,82	0,23	0,50	0,28	0,90
AD-53747,1	0,29	1,08	0,54	0,77	0,50	1,07
AD-53748,1	0,04	0,22	0,12	0,21	0,20	0,32
AD-53749,1	0,56	0,76	0,48	0,81	0,53	0,85
AD-53750,1	0,61	0,75	0,69	0,81	0,81	1,07
AD-53751,1	0,25	0,69	0,37	0,72	0,26	0,77
AD-53752,1	0,11	0,43	0,13	0,40	0,16	0,61
AD-53753,1	0,70	0,76	0,75	0,92	0,63	1,09
AD-53754,1	0,06	0,31	0,10	0,34	0,12	0,40
AD-53755,1	0,46	0,91	0,66	0,84	0,56	0,79
AD-53757,1	0,61	0,90	0,50	0,89	0,44	0,91
AD-53758,1	0,11	0,31	0,11	0,29	0,11	0,60
AD-53759,1	0,61	0,87	0,57	0,84	0,56	0,98
AD-53760,1	0,05	0,36	0,14	0,42	0,12	0,53
AD-53761,1	0,95	0,99	0,76	0,72	0,55	0,61
AD-53762,1	0,58	1,18	0,74	0,88	0,69	0,88
AD-53763,1	0,16	0,86	0,19	0,64	0,21	0,75
AD-53764,1	0,70	0,91	0,54	0,85	0,59	0,94
AD-53765,1	0,16	0,63	0,38	0,64	0,30	0,87
AD-53766,1	0,09	0,72	0,16	0,67	0,18	0,63
AD-53767,1	0,30	1,14	0,69	0,83	0,71	0,83
AD-53768,1	0,50	0,98	0,75	0,98	0,52	1,06
AD-53769,1	0,36	1,07	0,26	0,62	0,39	0,83
AD-53770,1	0,27	1,08	0,45	1,00	0,44	1,25
AD-53771,1	0,18	0,62	0,19	0,44	0,21	0,65
AD-53772,1	0,12	0,75	0,30	0,66	0,18	0,85
AD-53773,1	0,39	0,98	0,60	0,84	0,19	1,00

046901

AD-53774,1	0,07	0,54	0,25	0,40	0,20	0,71
AD-53776,1	0,33	0,97	0,45	0,94	0,34	0,95
AD-53777,1	0,06	0,39	0,18	0,30	0,11	0,41
AD-53778,1	0,09	0,72	0,24	0,69	0,23	0,78
AD-53779,1	0,47	0,66	0,68	0,67	0,57	0,81
AD-53780,1	0,29	0,93	0,61	0,71	0,42	0,92
AD-53781,1	0,41	0,99	0,38	0,87	0,28	1,09
AD-53782,1	0,56	0,47	0,56	0,89	0,41	1,16
AD-53783,1	0,16	0,68	0,32	0,46	0,34	0,61
AD-53784,1	0,15	0,71	0,27	0,72	0,25	0,80
AD-53785,1	0,17	0,90	0,57	0,71	0,29	0,64
AD-53786,1	0,11	0,78	0,28	0,48	0,24	0,74
AD-53787,1	0,34	0,72	0,56	1,04	0,46	0,81
AD-53788,1	0,36	0,83	0,46	0,95	0,32	0,65
AD-53789,1	0,09	0,43	0,18	0,42	0,12	0,47
AD-53790,1	0,10	0,74	0,30	0,65	0,31	0,81
AD-53791,1	0,07	0,51	0,20	0,30	0,16	0,58
AD-53792,1	0,05	0,40	0,11	0,30	0,17	0,64
AD-53793,1	0,23	1,19	0,42	0,84	0,45	1,12
AD-53794,1	0,43	1,15	0,65	0,67	0,42	0,95
AD-53795,1	0,08	0,37	0,15	0,34	0,12	0,48
AD-53796,1	0,07	0,33	0,19	0,49	0,15	0,58
AD-53797,1	0,10	0,43	0,16	0,39	0,20	0,62
AD-53798,1	0,04	0,31	0,09	0,29	0,16	0,60
AD-53799,1	0,22	0,71	0,30	0,85	0,27	0,85
AD-53800,1	0,09	0,34	0,16	0,35	0,14	0,51
AD-53801,1	0,09	0,28	0,25	0,55	0,20	0,54
AD-53802,1	0,10	0,31	0,20	0,40	0,15	0,72
AD-53803,1	0,07	0,27	0,08	0,21	0,14	0,29
AD-53804,1	0,18	0,57	0,29	0,47	0,27	0,79
AD-53805,1	0,69	0,85	0,68	0,85	0,48	1,01
AD-53806,1	0,07	0,38	0,18	0,43	0,13	0,50
AD-53807,1	0,29	0,61	0,26	0,71	0,28	0,68
AD-53808,1	0,15	0,68	0,26	0,50	0,28	0,72
AD-53809,1	0,04	0,23	0,17	0,22	0,12	0,31

AD-53810,1	0,31	0,88	0,30	0,55	0,36	0,85
AD-53811,1	0,28	0,77	0,33	0,57	0,39	0,87
AD-53812,1	0,12	0,69	0,16	0,62	0,22	0,79
AD-53813,1	0,11	0,33	0,18	0,26	0,17	0,40
AD-53814,1	0,12	0,59	0,57	0,60	0,29	0,57
AD-53815,1	0,03	0,27	0,11	0,18	0,18	0,33
AD-53816,1	0,16	0,89	0,24	0,62	0,32	0,75
AD-53817,1	0,26	0,98	0,44	0,69	0,44	1,18
AD-53818,1	0,12	0,71	0,21	0,55	0,21	0,70
AD-53819,1	0,09	0,52	0,12	0,45	0,12	0,46
AD-53820,1	0,20	0,96	0,27	0,67	0,34	0,74
AD-53821,1	0,04	0,29	0,10	0,23	0,13	0,29
AD-53822,1	0,54	1,05	0,60	0,91	0,48	0,96
AD-53823,1	0,21	0,76	0,41	0,59	0,33	0,85
AD-53824,1	0,16	0,78	0,40	0,51	0,36	0,70
AD-53825,1	0,05	0,40	0,12	0,31	0,24	0,73
AD-53826,1	0,04	0,34	0,10	0,21	0,20	0,34
AD-53827,1	0,40	1,11	0,40	0,84	0,31	1,15
AD-53828,1	0,17	0,51	0,23	0,55	0,17	1,14
AD-53829,1	0,06	0,71	0,21	0,58	0,24	1,21
AD-53830,1	0,07	0,27	0,06	0,30	0,15	0,43
AD-53831,1	0,09	0,56	0,21	0,39	0,16	0,95
AD-53832,1	0,08	0,52	0,26	0,31	0,11	0,76
AD-53833,1	1,04	1,05	0,74	1,24	0,60	1,58
AD-53834,1	0,70	1,14	0,71	0,85	0,38	1,47
AD-53835,1	0,11	0,43	0,33	0,35	0,09	0,53
PBS	0,67	1,13	0,90	0,90	0,99	0,99

Таблица 5
Значения IC₅₀ для PCSK9 для выбранных дуплексов при свободном поглощении клетками макаков-крабоедов и при трансфекции в клеточной линии Нер3В человека

	Трансфекция	Свободное поглощение
Дуплекс	IC ₅₀ , нМ	IC ₅₀ , нМ
AD-53806.1	0,07	18,00
AD-53748.1	0,06	16,88
AD-53815.1	0,05	39,21
AD-53809.1	0,05	571,00
AD-53821.1	0,05	55,41
AD-53830.1	0,08	не определено
AD-53754.1	0,25	67,42
AD-53800.1	0,30	не определено
AD-53798.1	0,04	не определено
AD-53789.1	0,37	не определено
AD-48400.4	0,23	не определено

AD-48400 также оценивали в отношении эффективности *in vivo* на самках мышей, несущих трансген PCSK9 человека, произвольно вставленный в геном без нарушения эндогенного гена PCSK9. Вкратце, мышам вводили инъекцией подкожно разовую дозу 20 мг/кг в 0 день, разовую дозу 100 мг/кг в 0 день и пять доз 20 мг/кг в 0, 1, 2, 3, 4 и 5 дни. Сыворотку собирали в -6, -3, 0, 1, 2, 3, 4 и 7 дни и количество белка PCSK9 определяли при помощи анализа ELISA. Результаты этих анализов показаны на фиг. 2, и по ним видно, что для AD-48400, конъюгированного с GalNAc, при всех трех исследованных дозах существует дозозависимый эффект.

Шесть наиболее эффективных дуплексов, определенных при помощи тестов *in vitro*, описанных выше, оценивали в отношении эффективности и длительности ответа *in vivo*. Трансгенным по PCSK9 мышам вводили инъекцией в 0, 1, 2, 3 и 4 дни либо 5 мг/кг, либо 25 мг/кг AD-48400, AD-53830, AD-53806, AD-53815, AD-53748 или AD-53798. Уровни белка PCSK9 в сыворотке определяли при помощи ELISA в -3, 0, 1, 2, 3, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 26, 31 и 36 дни. Результаты показаны на фиг. 3А и 3В.

Пример 3. Оптимизация прототипа.

Исходя из анализов на эффективность, описанных в примере 2 выше, siRNA к PCSK9, основанные на исходных последовательностях AD-53815 и AD-53806, с рядом химических модификаций, оценивали на эффективность в анализах со свободным поглощением первичными гепатоцитами макаков-крабоедов (PCH) при 200 нМ, 20 нМ, 2 нМ и 0,2 нМ. Для всех доз, за исключением дозы 0,2 нМ, анализы выполняли дважды и данные выражали как среднюю долю оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю. Дозу 0,2 нМ оценивали один раз. Результаты этих анализов показаны в табл. 6.

Тесты на эффективность для оптимизации прототипа AD-53815 и AD-53806 при помощи свободного поглощения гепатоцитами макаков-крабоедов

Исходный дуплекс	ID дуплекса	200 нм, средн.	20 нм, средн.	2 нм, средн.	0,2 нм-384	200 нм, SD	20 нм, SD	2 нм, SD
AD-53815	AD-53815,5	0,45	0,48	0,74	0,95	0,05	0,00	0,05
AD-53815	AD-53815,4	0,43	0,54	0,84	0,83	0,00	0,04	0,10
AD-53815	AD-56633,1	0,33	0,52	0,82	0,88	0,04	0,01	0,10
AD-53815	AD-56617,1	0,40	0,65	0,91	1,06	0,03	0,02	0,03
AD-53815	AD-56623,1	0,52	0,61	0,87	1,05	0,03	0,04	0,21
AD-53815	AD-56629,1	0,50	0,62	0,87	1,05	0,04	0,13	0,17
AD-53815	AD-56635,1	0,45	0,71	0,92	1,03	0,03	0,02	0,03
AD-53815	AD-56641,1	0,47	0,73	0,84	1,04	0,04	0,00	0,17
AD-53815	AD-56625,1	0,49	0,55	0,82	1,12	0,01	0,16	0,16
AD-53815	AD-56631,1	0,48	0,57	0,82	1,05	0,04	0,11	0,06
AD-53815	AD-56637,1	0,48	0,58	0,76	1,01	0,01	0,14	0,13
AD-53815	AD-56643,1	0,59	0,77	0,93	1,04	0,05	0,01	0,04
AD-53815	AD-56649,1	0,76	0,87	0,95	1,06	0,02	0,07	0,14
AD-53815	AD-56655,1	0,73	0,86	0,85	0,96	0,01	0,04	0,11
AD-53815	AD-56615,1	0,58	0,70	0,92	0,98	0,00	0,02	0,03
AD-53815	AD-56621,1	0,71	0,76	0,93	0,95	0,18	0,07	0,07
AD-53815	AD-56627,1	0,58	0,72	0,93	0,94	0,01	0,08	0,02
AD-53815	AD-56639,1	0,52	0,57	0,72	0,94	0,16	0,00	0,04
AD-53815	AD-56645,1	0,32	0,49	0,74	0,88	0,03	0,03	0,14
AD-53815	AD-56651,1	0,71	0,94	0,88	0,88	0,08	0,29	0,12
AD-53815	AD-56610,1	0,31	0,57	0,82	0,93	0,02	0,01	0,04
AD-53815	AD-56616,1	0,47	0,68	0,70	1,01	0,06	0,08	0,34
AD-53815	AD-56622,1	0,47	0,66	0,88	0,95	0,06	0,10	0,10
AD-53815	AD-56628,1	1,02	1,15	1,04	0,99	0,00	0,12	0,02
AD-53815	AD-56634,1	0,75	0,90	0,97	1,03	0,11	0,04	0,07
AD-53815	AD-56640,1	0,58	0,76	0,81	1,01	0,10	0,05	0,12
AD-53815	AD-56646,1	0,77	0,94	0,82	0,99	0,09	0,12	0,14
AD-53815	AD-56652,1	0,61	0,74	0,78	0,89	0,00	0,00	0,03

046901

AD-53815	AD-56611,1	0,93	1,02	1,16	0,89	0,05	0,15	0,05
AD-53815	AD-56647,1	0,38	0,58	0,79	0,94	0,05	0,08	0,00
AD-53815	AD-56653,1	0,47	0,46	0,63	0,84	0,12	0,04	0,04
AD-53815	AD-56612,1	0,41	0,61	0,88	0,85	0,03	0,09	0,09
AD-53815	AD-56618,1	0,64	0,60	1,03	1,08	0,21	0,09	0,01
AD-53815	AD-56624,1	0,46	0,61	0,85	1,05	0,04	0,17	0,15
AD-53815	AD-56630,1	0,49	0,69	0,87	1,01	0,01	0,00	0,15
AD-53815	AD-56636,1	0,49	0,57	0,82	1,13	0,01	0,05	0,03
AD-53815	AD-56642,1	0,43	0,55	0,82	1,09	0,00	0,08	0,03
AD-53815	AD-56648,1	0,48	0,66	0,80	0,96	0,00	0,04	0,08
AD-53815	AD-56654,1	0,43	0,53	0,72	0,84	0,01	0,00	0,07
AD-53815	AD-56613,1	0,54	0,61	0,81	0,91	0,16	0,08	0,19
AD-53815	AD-56619,1	0,55	0,67	1,02	1,06	0,04	0,07	0,07
AD-53815	AD-56614,1	0,42	0,56	0,86	0,90	0,05	0,04	0,10
AD-53815	AD-56620,1	0,41	0,52	0,85	0,84	0,01	0,12	0,08
AD-53815	AD-56626,1	0,59	0,68	0,90	1,12	0,01	0,03	0,10
AD-53815	AD-56632,1	0,60	0,73	0,91	1,05	0,04	0,09	0,10
AD-53815	AD-56638,1	0,68	0,89	0,94	1,19	0,03	0,03	0,18
AD-53815	AD-56644,1	0,84	0,89	1,09	1,09	0,08	0,08	0,06
AD-53815	AD-56650,1	0,86	0,95	1,05	1,05	0,10	0,01	0,10
AD-53815	AD-56656,1	0,53	0,64	0,92	0,88	0,09	0,04	0,14
AD-53815	AD-56662,1	0,55	0,61	0,96	1,03	0,02	0,09	0,01
AD-53815	AD-56668,1	0,76	0,79	0,99	1,10	0,07	0,11	0,06
AD-53815	AD-56673,1	0,81	0,87	1,12	1,09	0,01	0,15	0,13
AD-53815	AD-56678,1	0,84	0,76	1,12	1,05	0,04	0,24	0,05
AD-53815	AD-56683,1	0,88	0,93	1,08	1,06	0,05	0,10	0,06
AD-53815	AD-56688,1	0,80	0,86	0,93	0,99	0,10	0,11	0,19
AD-53815	AD-56657,1	0,45	0,63	0,84	0,88	0,20	0,04	0,09
AD-53815	AD-56663,1	0,35	0,49	0,77	1,03	0,00	0,07	0,04
AD-53815	AD-56669,1	0,53	0,68	0,99	1,11	0,00	0,18	0,03
AD-53815	AD-56674,1	0,44	0,64	0,84	1,03	0,06	0,01	0,17
AD-53815	AD-56679,1	0,52	0,67	0,77	1,01	0,01	0,06	0,14
AD-53815	AD-56684,1	0,43	0,59	0,84	1,08	0,01	0,03	0,04
AD-53815	AD-56689,1	0,55	0,57	0,73	0,95	0,09	0,01	0,11
AD-53815	AD-56693,1	0,45	0,48	0,65	0,84	0,04	0,02	0,11

046901

AD-53815	AD-56658,1	0,46	0,55	0,85	0,84	0,21	0,09	0,07
AD-53815	AD-56664,1	0,35	0,60	0,80	0,91	0,13	0,03	0,14
AD-53815	AD-56670,1	0,62	0,61	0,90	1,11	0,17	0,06	0,00
AD-53815	AD-56680,1	0,74	0,90	1,00	0,91	0,05	0,01	0,05
AD-53815	AD-56685,1	0,64	0,64	0,77	1,07	0,15	0,01	0,15
AD-53815	AD-56690,1	0,39	0,61	0,75	0,97	0,13	0,03	0,08
AD-53815	AD-56694,1	0,41	0,53	0,67	0,94	0,01	0,00	0,04
AD-53815	AD-56659,1	0,57	0,58	0,84	0,95	0,25	0,09	0,05
AD-53815	AD-56665,1	0,38	0,51	0,78	1,01	0,05	0,07	0,17
AD-53815	AD-56671,1	0,32	0,45	0,78	0,94	0,03	0,05	0,01
AD-53815	AD-56676,1	0,31	0,55	0,81	1,02	0,03	0,13	0,02
AD-53815	AD-56681,1	0,54	0,75	0,88	1,02	0,02	0,07	0,11
AD-53815	AD-56686,1	0,50	0,74	0,86	1,03	0,01	0,10	0,10
AD-53815	AD-56691,1	0,44	0,56	0,79	1,03	0,01	0,00	0,05
AD-53815	AD-56695,1	0,37	0,70	0,67	0,89	0,01	0,29	0,11
AD-53815	AD-56660,1	0,36	0,73	0,83	0,93	0,02	0,22	0,10
AD-53815	AD-56666,1	0,39	0,47	0,74	0,94	0,02	0,05	0,13
AD-53815	AD-56672,1	0,63	0,55	0,87	1,03	0,25	0,10	0,04
AD-53815	AD-56677,1	0,54	0,70	0,85	0,99	0,24	0,11	0,00
AD-53815	AD-56682,1	0,48	0,57	0,90	0,96	0,11	0,09	0,05
AD-53815	AD-56687,1	0,81	0,94	1,06	1,08	0,07	0,02	0,05
AD-53815	AD-56692,1	0,45	0,64	0,73	0,95	0,03	0,13	0,05
AD-53815	AD-56696,1	0,40	0,48	0,66	0,95	0,01	0,04	0,06
AD-53815	AD-56661,1	0,52	0,54	0,75	0,98	0,22	0,06	0,04
AD-53815	AD-56667,1	0,40	0,68	0,87	1,03	0,03	0,03	0,11
AD-53806	AD-53806,11	0,28	0,44	0,74	0,98	0,05	0,01	0,13
AD-53806	AD-53806,13	0,31	0,36	0,65	0,92	0,01	0,08	0,06
AD-53806	AD-53806,12	0,53	0,56	0,70	1,04	0,00	0,01	0,15
AD-53806	AD-53806,5	0,34	0,54	0,85	0,87	0,01	0,00	0,10
AD-53806	AD-53806,6	0,41	0,51	0,77	0,91	0,05	0,04	0,08
AD-53806	AD-53806,7	0,39	0,58	0,75	0,97	0,02	0,16	0,14
AD-53806	AD-53806,8	0,35	0,49	0,69	0,91	0,06	0,03	0,09
AD-53806	AD-53806,9	0,36	0,55	0,77	1,01	0,04	0,07	0,13
AD-53806	AD-53806,10	0,29	0,44	0,73	0,93	0,04	0,10	0,14
AD-53806	AD-56979,1	0,43	0,50	0,78	0,96	0,01	0,03	0,11

046901

AD-53806	AD-56979,2	0,32	0,47	0,65	1,02	0,02	0,11	0,05
AD-53806	AD-56975,3	0,27	0,57	0,72	0,83	0,01	0,16	0,08
AD-53806	AD-56975,4	0,55	0,67	0,81	0,92	0,11	0,10	0,04
AD-53806	AD-56975,5	0,34	0,54	0,71	0,94	0,04	0,22	0,10
AD-53806	AD-56975,1	0,38	0,53	0,74	0,93	0,13	0,14	0,02
AD-53806	AD-56975,2	0,50	0,62	0,82	0,98	0,09	0,16	0,11
AD-53806	AD-56983,1	0,49	0,72	0,89	1,11	0,10	0,09	0,21
AD-53806	AD-56983,2	0,74	0,89	1,14	1,16	0,10	0,06	0,02
AD-53806	AD-56983,3	0,91	1,05	1,02	1,04	0,09	0,10	0,08
AD-53806	AD-56983,4	0,40	0,57	0,83	1,05	0,03	0,02	0,08
AD-53806	AD-56983,5	0,33	0,51	0,83	0,90	0,03	0,04	0,03
AD-53806	AD-56977,3	0,44	0,49	0,62	0,95	0,17	0,16	0,06
AD-53806	AD-56977,1	0,27	0,58	0,81	0,88	0,06	0,07	0,08
AD-53806	AD-56977,2	0,41	0,60	0,81	0,90	0,01	0,07	0,12
AD-53806	AD-56976,1	0,40	0,64	0,85	0,90	0,14	0,21	0,01
AD-53806	AD-56976,2	0,37	0,47	0,70	1,01	0,09	0,10	0,13
AD-53806	AD-56980,1	0,47	0,54	0,83	0,97	0,12	0,02	0,14
AD-53806	AD-56980,2	0,44	0,55	0,81	1,08	0,15	0,11	0,08
AD-53806	AD-56984,1	0,41	0,63	0,81	1,08	0,04	0,07	0,14
AD-53806	AD-56984,2	0,32	0,58	0,86	1,04	0,02	0,17	0,07
AD-53806	AD-56987,1	0,37	0,63	0,82	1,11	0,08	0,08	0,05
AD-53806	AD-56987,2	0,33	0,59	0,79	1,02	0,05	0,05	0,13
AD-53806	AD-56991,1	0,36	0,57	0,73	1,08	0,01	0,07	0,18
AD-53806	AD-56993,1	0,41	0,54	0,75	0,99	0,12	0,09	0,06
AD-53806	AD-56995,1	0,35	0,45	0,67	1,00	0,07	0,02	0,12
AD-53806	AD-56978,1	0,35	0,67	0,88	0,91	0,04	0,22	0,05
AD-53806	AD-56978,2	0,47	0,55	0,78	1,12	0,03	0,01	0,07
AD-53806	AD-56981,1	0,45	0,65	0,86	1,08	0,01	0,16	0,15
AD-53806	AD-56985,1	0,53	0,61	1,08	1,14	0,02	0,09	0,07
AD-53806	AD-56988,1	0,62	0,81	0,91	1,13	0,01	0,05	0,20
AD-53806	AD-56988,2	0,76	0,94	0,85	1,14	0,17	0,10	0,11
AD-53806	AD-56988,3	0,55	0,79	0,86	1,19	0,04	0,05	0,16
AD-53806	AD-56982,1	0,40	0,65	0,84	1,07	0,04	0,10	0,09
AD-53806	AD-56982,2	0,38	0,50	0,70	1,01	0,03	0,03	0,08
AD-53806	AD-56986,1	0,45	0,57	0,80	1,12	0,02	0,11	0,15

046901

AD-53806	AD-56986,2	0,49	0,59	0,79	1,04	0,01	0,05	0,17
AD-53806	AD-56989,1	0,69	0,84	0,95	1,12	0,08	0,06	0,12
AD-53806	AD-56990,1	0,49	0,56	0,79	1,08	0,03	0,02	0,13
AD-53806	AD-56992,1	0,61	0,70	0,90	1,14	0,01	0,04	0,14
AD-53806	AD-56992,2	0,48	0,63	0,87	0,99	0,05	0,10	0,07
AD-53806	AD-56994,1	0,88	0,89	0,97	1,11	0,02	0,06	0,13
AD-53806	AD-56994,2	0,34	0,42	0,73	0,98	0,01	0,05	0,05
AD-53806	AD-56996,1	0,50	0,59	0,77	0,95	0,07	0,12	0,10
AD-53806	AD-57001,1	0,44	0,54	0,77	1,08	0,01	0,05	0,12
AD-53806	AD-57007,1	0,62	0,68	0,91	1,11	0,04	0,02	0,19
AD-53806	AD-57013,1	0,65	0,78	0,94	1,17	0,05	0,04	0,22
AD-53806	AD-57019,1	0,57	0,74	0,87	1,14	0,01	0,09	0,13
AD-53806	AD-57022,1	0,46	0,48	0,72	0,98	0,14	0,01	0,17
AD-53806	AD-57025,1	0,37	0,47	0,68	0,92	0,04	0,11	0,06
AD-53806	AD-56997,1	0,41	0,56	0,77	0,88	0,00	0,10	0,09
AD-53806	AD-57002,1	0,46	0,58	0,81	1,04	0,03	0,03	0,08
AD-53806	AD-57008,1	0,68	0,75	0,91	1,13	0,02	0,03	0,15
AD-53806	AD-57014,1	0,80	0,82	0,99	1,17	0,02	0,01	0,12
AD-53806	AD-57020,1	0,51	0,53	0,81	1,07	0,17	0,03	0,07
AD-53806	AD-57020,2	0,37	0,46	0,68	1,02	0,04	0,07	0,13
AD-53806	AD-57026,1	0,34	0,51	0,68	0,97	0,01	0,08	0,06
AD-53806	AD-57003,1	0,76	0,90	0,94	1,11	0,02	0,16	0,11
AD-53806	AD-57009,1	0,81	0,88	0,93	0,98	0,01	0,03	0,10
AD-53806	AD-57015,1	0,72	0,92	0,90	1,04	0,01	0,05	0,15
AD-53806	AD-57023,1	0,41	0,50	0,75	1,00	0,08	0,07	0,06
AD-53806	AD-57027,1	0,38	0,46	0,68	0,93	0,11	0,00	0,07
AD-53806	AD-56998,1	0,45	0,57	0,94	0,98	0,01	0,06	0,11
AD-53806	AD-57004,1	0,39	0,61	0,80	1,13	0,03	0,04	0,13
AD-53806	AD-57010,1	0,43	0,64	0,81	1,00	0,01	0,07	0,15
AD-53806	AD-57016,1	0,44	0,71	0,80	0,97	0,01	0,25	0,05
AD-53806	AD-56999,2	0,49	0,60	0,69	1,04	0,04	0,02	0,16
AD-53806	AD-56999,1	0,39	0,55	0,68	0,96	0,01	0,09	0,10
AD-53806	AD-57021,1	0,40	0,58	0,71	1,02	0,03	0,03	0,11
AD-53806	AD-57024,1	0,41	0,49	0,68	1,02	0,14	0,00	0,10
AD-53806	AD-57005,1	0,45	0,56	0,87	1,06	0,03	0,03	0,20

AD-53806	AD-57011,1	0,53	0,63	0,92	1,02	0,02	0,07	0,10
AD-53806	AD-57017,1	0,48	0,60	0,81	1,07	0,00	0,01	0,12
AD-53806	AD-57000,2	0,50	0,60	0,74	0,93	0,04	0,01	0,02
AD-53806	AD-57000,3	0,54	0,49	0,72	0,97	0,22	0,08	0,00
AD-53806	AD-57000,1	0,70	0,76	0,80	0,95	0,02	0,05	0,04
AD-53806	AD-57006,2	0,48	0,75	0,76	0,94	0,00	0,31	0,12
AD-53806	AD-57006,3	0,45	0,57	0,71	0,98	0,08	0,09	0,12
AD-53806	AD-57006,1	0,64	0,76	0,84	0,97	0,00	0,11	0,10
AD-53806	AD-57012,1	0,53	0,83	0,79	0,93	0,04	0,42	0,02
AD-53806	AD-57018,1	0,67	0,73	0,72	0,93	0,07	0,04	0,03

siRNA с рядом химических модификаций, основанные на исходных последовательностях AD-53815 и AD-53806, также подвергали отбору в отношении эффективности *in vitro* при помощи трансфекции клеток Нер3В при 10 нМ и 0,1 нМ. Результаты этого теста на структурно-функциональную взаимосвязь показаны в табл. 7, и они выражены как средняя доля оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю +/- SD.

Таблица 7

Тесты на эффективность для оптимизации прототипа AD-53815 и AD-53806 при помощи трансфекции клеток человека

Исходный дуплекс	ID дуплекса	Транс., 10 нМ, средн.	Транс., 10 нМ, SD	Транс., 0,1 нМ, средн.	Транс., 0,1 нМ, SD
AD-53815	AD-53815,5	0,14	0,05	0,24	не определено
AD-53815	AD-53815,4	0,18	0,07	0,38	не определено
AD-53815	AD-56633,1	0,18	0,10	0,24	не определено
AD-53815	AD-56617,1	0,13	0,06	0,25	не определено
AD-53815	AD-56623,1	0,14	0,05	0,24	не определено
AD-53815	AD-56629,1	0,14	0,02	0,17	не определено
AD-53815	AD-56635,1	0,12	0,02	0,22	не определено
AD-53815	AD-56641,1	0,15	0,01	0,16	не определено
AD-53815	AD-56625,1	0,12	0,03	0,29	не определено
AD-53815	AD-56631,1	0,13	0,01	0,20	не определено
AD-53815	AD-56637,1	0,22	0,14	0,16	не определено

046901

AD-53815	AD-56643,1	0,18	0,08	0,16	не определено
AD-53815	AD-56649,1	0,16	0,00	0,19	не определено
AD-53815	AD-56655,1	0,24	0,11	0,24	не определено
AD-53815	AD-56615,1	0,15	0,00	0,32	не определено
AD-53815	AD-56621,1	0,20	0,07	0,41	не определено
AD-53815	AD-56627,1	0,17	0,04	0,31	не определено
AD-53815	AD-56639,1	0,19	0,08	0,24	не определено
AD-53815	AD-56645,1	0,19	0,09	0,27	не определено
AD-53815	AD-56651,1	0,29	0,09	0,68	не определено
AD-53815	AD-56610,1	0,21	0,11	0,23	не определено
AD-53815	AD-56616,1	0,16	0,04	0,29	не определено
AD-53815	AD-56622,1	0,18	0,07	0,36	не определено
AD-53815	AD-56628,1	0,28	0,07	0,60	не определено
AD-53815	AD-56634,1	0,16	0,04	0,29	не определено
AD-53815	AD-56640,1	0,21	0,09	0,26	не определено
AD-53815	AD-56646,1	0,27	0,21	0,37	не определено
AD-53815	AD-56652,1	0,26	0,08	0,29	не определено
AD-53815	AD-56611,1	0,35	0,11	0,96	не определено
AD-53815	AD-56647,1	0,17	0,09	0,13	не определено
AD-53815	AD-56653,1	0,17	0,09	0,28	не определено
AD-53815	AD-56612,1	0,17	0,07	0,24	не определено
AD-53815	AD-56618,1	0,14	0,00	0,26	не определено
AD-53815	AD-56624,1	0,15	0,02	0,27	не определено
AD-53815	AD-56630,1	0,13	0,01	0,24	не определено
AD-53815	AD-56636,1	0,17	0,08	0,22	не определено
AD-53815	AD-56642,1	0,12	0,03	0,13	не определено
AD-53815	AD-56648,1	0,15	0,05	0,21	не определено
AD-53815	AD-56654,1	0,22	0,10	0,24	не определено
AD-53815	AD-56613,1	0,17	0,07	0,40	не определено
AD-53815	AD-56619,1	0,21	0,12	0,30	не определено
AD-53815	AD-56614,1	0,12	0,01	0,23	не определено
AD-53815	AD-56620,1	0,12	0,02	0,15	не определено
AD-53815	AD-56626,1	0,14	0,03	0,20	не определено
AD-53815	AD-56632,1	0,12	0,02	0,21	не определено
AD-53815	AD-56638,1	0,15	0,10	0,23	не определено

046901

AD-53815	AD-56644,1	0,23	0,11	0,17	не определено
AD-53815	AD-56650,1	0,13	0,03	0,20	не определено
AD-53815	AD-56656,1	0,26	0,03	0,27	не определено
AD-53815	AD-56662,1	0,13	0,06	0,18	не определено
AD-53815	AD-56668,1	0,19	0,05	0,20	не определено
AD-53815	AD-56673,1	0,18	0,05	0,21	не определено
AD-53815	AD-56678,1	0,17	0,00	0,20	не определено
AD-53815	AD-56683,1	0,29	0,22	0,27	не определено
AD-53815	AD-56688,1	0,19	0,02	0,18	не определено
AD-53815	AD-56657,1	0,18	0,14	0,34	не определено
AD-53815	AD-56663,1	0,11	0,04	0,18	не определено
AD-53815	AD-56669,1	0,11	0,02	0,31	не определено
AD-53815	AD-56674,1	0,14	0,00	0,21	не определено
AD-53815	AD-56679,1	0,14	0,05	0,19	не определено
AD-53815	AD-56684,1	0,14	0,03	0,19	не определено
AD-53815	AD-56689,1	0,18	0,09	0,18	не определено
AD-53815	AD-56693,1	0,19	0,11	0,21	не определено
AD-53815	AD-56658,1	0,19	0,13	0,30	не определено
AD-53815	AD-56664,1	0,15	0,07	0,20	не определено
AD-53815	AD-56670,1	0,18	0,10	0,26	не определено
AD-53815	AD-56680,1	0,27	0,05	0,31	не определено
AD-53815	AD-56685,1	0,14	0,02	0,28	не определено
AD-53815	AD-56690,1	0,10	0,03	0,18	не определено
AD-53815	AD-56694,1	0,15	0,06	0,17	не определено
AD-53815	AD-56659,1	0,16	0,04	0,27	не определено
AD-53815	AD-56665,1	0,14	0,06	0,26	не определено
AD-53815	AD-56671,1	0,11	0,01	0,29	не определено
AD-53815	AD-56676,1	0,14	0,06	0,20	не определено
AD-53815	AD-56681,1	0,15	0,03	0,30	не определено
AD-53815	AD-56686,1	0,15	0,03	0,26	не определено
AD-53815	AD-56691,1	0,11	0,02	0,16	не определено
AD-53815	AD-56695,1	0,14	0,06	0,24	не определено
AD-53815	AD-56660,1	0,10	0,03	0,37	не определено
AD-53815	AD-56666,1	0,18	0,13	0,22	не определено
AD-53815	AD-56672,1	0,14	0,02	0,35	не определено

046901

AD-53815	AD-56677,1	0,15	0,04	0,23	не определено
AD-53815	AD-56682,1	0,14	0,06	0,28	не определено
AD-53815	AD-56687,1	0,24	0,01	0,53	не определено
AD-53815	AD-56692,1	0,09	0,01	0,36	не определено
AD-53815	AD-56696,1	0,16	0,09	0,26	не определено
AD-53815	AD-56661,1	0,21	0,15	0,48	не определено
AD-53815	AD-56667,1	0,22	0,16	0,26	не определено
AD-53806	AD-53806,11	0,19	0,05	0,25	0,06
AD-53806	AD-53806,13	0,21	0,07	0,21	0,16
AD-53806	AD-53806,12	0,21	0,08	0,21	0,02
AD-53806	AD-53806,5	0,22	0,01	0,29	0,06
AD-53806	AD-53806,6	0,24	0,07	0,33	0,12
AD-53806	AD-53806,7	0,19	0,02	0,24	0,11
AD-53806	AD-53806,8	0,20	0,01	0,23	0,05
AD-53806	AD-53806,9	0,22	0,01	0,19	0,06
AD-53806	AD-53806,10	0,17	0,01	0,21	0,07
AD-53806	AD-56979,1	0,18	0,00	0,29	0,14
AD-53806	AD-56979,2	0,24	0,11	0,24	0,12
AD-53806	AD-56975,3	0,26	0,09	0,28	0,18
AD-53806	AD-56975,4	0,35	0,02	0,50	0,23
AD-53806	AD-56975,5	0,17	0,01	0,21	0,18
AD-53806	AD-56975,1	0,24	0,09	0,32	0,12
AD-53806	AD-56975,2	0,19	0,04	0,16	0,02
AD-53806	AD-56983,1	0,17	0,01	0,32	0,18
AD-53806	AD-56983,2	0,28	0,07	0,63	0,15
AD-53806	AD-56983,3	1,22	0,61	0,83	0,02
AD-53806	AD-56983,4	0,25	0,10	0,24	0,10
AD-53806	AD-56983,5	0,17	0,01	0,26	0,15
AD-53806	AD-56977,3	0,31	0,11	0,28	0,23
AD-53806	AD-56977,1	0,22	0,04	0,34	0,12
AD-53806	AD-56977,2	0,22	0,05	0,29	0,16
AD-53806	AD-56976,1	0,21	0,09	0,34	0,20
AD-53806	AD-56976,2	0,17	0,03	0,25	0,04
AD-53806	AD-56980,1	0,22	0,04	0,20	0,02
AD-53806	AD-56980,2	0,19	0,01	0,20	0,06

046901

AD-53806	AD-56984,1	0,24	0,11	0,22	0,10
AD-53806	AD-56984,2	0,19	0,01	0,21	0,10
AD-53806	AD-56987,1	0,19	0,05	0,29	0,19
AD-53806	AD-56987,2	0,24	0,03	0,24	0,09
AD-53806	AD-56991,1	0,17	0,01	0,17	0,08
AD-53806	AD-56993,1	0,14	0,09	0,22	0,06
AD-53806	AD-56995,1	0,19	0,07	0,27	0,13
AD-53806	AD-56978,1	0,27	0,12	0,36	0,12
AD-53806	AD-56978,2	0,24	0,03	0,20	0,01
AD-53806	AD-56981,1	0,22	0,03	0,28	0,17
AD-53806	AD-56985,1	0,21	0,00	0,28	0,04
AD-53806	AD-56988,1	0,20	0,02	0,24	0,02
AD-53806	AD-56988,2	0,20	0,03	0,27	0,13
AD-53806	AD-56988,3	0,23	0,03	0,27	0,01
AD-53806	AD-56982,1	0,23	0,06	0,24	0,00
AD-53806	AD-56982,2	0,21	0,06	0,18	0,07
AD-53806	AD-56986,1	0,23	0,05	0,20	0,06
AD-53806	AD-56986,2	0,24	0,04	0,25	0,13
AD-53806	AD-56989,1	0,31	0,02	0,43	0,00
AD-53806	AD-56990,1	0,27	0,00	0,28	0,10
AD-53806	AD-56992,1	0,27	0,06	0,31	0,01
AD-53806	AD-56992,2	0,22	0,10	0,30	0,14
AD-53806	AD-56994,1	0,97	0,05	0,85	0,09
AD-53806	AD-56994,2	0,22	0,09	0,26	0,01
AD-53806	AD-56996,1	0,18	0,04	0,31	0,08
AD-53806	AD-57001,1	0,24	0,09	0,23	0,08
AD-53806	AD-57007,1	0,25	0,01	0,27	0,03
AD-53806	AD-57013,1	0,30	0,08	0,33	0,02
AD-53806	AD-57019,1	0,29	0,03	0,28	0,02
AD-53806	AD-57022,1	0,20	0,06	0,21	0,05
AD-53806	AD-57025,1	0,23	0,12	0,25	0,15
AD-53806	AD-56997,1	0,20	0,05	0,25	0,11
AD-53806	AD-57002,1	0,21	0,07	0,28	0,01
AD-53806	AD-57008,1	0,26	0,01	0,31	0,01
AD-53806	AD-57014,1	0,32	0,03	0,43	0,05

AD-53806	AD-57020,1	0,19	0,00	0,23	0,01
AD-53806	AD-57020,2	0,20	0,08	0,28	0,22
AD-53806	AD-57026,1	0,34	0,24	0,37	0,24
AD-53806	AD-57003,1	0,34	0,04	0,45	0,15
AD-53806	AD-57009,1	0,30	0,07	0,40	0,02
AD-53806	AD-57015,1	0,32	0,01	0,47	0,04
AD-53806	AD-57023,1	0,17	0,06	0,27	0,13
AD-53806	AD-57027,1	0,20	0,03	0,19	0,11
AD-53806	AD-56998,1	0,23	0,09	0,29	0,24
AD-53806	AD-57004,1	0,24	0,13	0,30	0,12
AD-53806	AD-57010,1	0,23	0,09	0,23	0,11
AD-53806	AD-57016,1	0,21	0,03	0,23	0,06
AD-53806	AD-56999,2	0,25	0,10	0,35	0,05
AD-53806	AD-56999,1	0,24	0,08	0,28	0,21
AD-53806	AD-57021,1	0,18	0,04	0,29	0,17
AD-53806	AD-57024,1	0,20	0,09	0,28	0,11
AD-53806	AD-57005,1	0,18	0,10	0,29	0,17
AD-53806	AD-57011,1	0,21	0,07	0,26	0,12
AD-53806	AD-57017,1	0,20	0,07	0,29	0,21
AD-53806	AD-57000,2	0,20	0,04	0,29	0,21
AD-53806	AD-57000,3	0,22	0,11	0,30	0,16
AD-53806	AD-57000,1	0,25	0,14	0,38	0,33
AD-53806	AD-57006,2	0,22	0,14	0,31	0,18
AD-53806	AD-57006,3	0,19	0,09	0,31	0,25
AD-53806	AD-57006,1	0,20	0,12	0,41	0,29
AD-53806	AD-57012,1	0,16	0,05	0,36	0,17
AD-53806	AD-57018,1	0,20	0,37	0,10	0,14

Для того чтобы определить, является ли любая из siRNA из *in vitro* SAR-теста более эффективной в отношении сайленсинга PCSK9, чем исходная siRNA (AD-53815) к PCSK9, трансгенным мышам вводили разовую дозу siRNA 3 мг/кг, как показано на фиг. 4, и через 72 ч после введения дозы уровни белка PCSK9 определяли при помощи анализа ELISA. Результаты, показанные на фиг. 5, свидетельствуют о том, что AD-57928 неожиданно эффективно в отношении сайленсинга PCSK9. На фиг. 6 показано, что не только разовая доза AD-57928 эффективно осуществляла "нокдаун" экспрессии белка PCSK9, но также имел место дозозависимый эффект при применении AD-57928.

Пример 4. Исследование с дробной дозой с применением AD-57928.

Способность AD-57928 подавлять экспрессию белка PCSK9 оценивали путем измерения уровней белка PCSK9 человека (hPCSK9) в сыворотке трансгенных по hPCSK9 мышей после введения AD-57928. AD-57928 вводили подкожно, используя шесть различных схем дозирования, которые включали "фазу насыщения" в течение первой недели (одна доза 0,5 мг/кг, 1 мг/кг или 2 мг/кг ежедневно на протяжении 5 последовательных дней) с последующей "фазой поддержания" (один или два раза в неделю вводили дозу либо 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, либо в 2 мг/кг на протяжении 5 недель), которые описаны в табл. 8 ниже. Последнюю дозу вводили на 38 день. Каждую схему дозирования исследовали, используя группу из 3 мышей, которая включала двух самцов и одну самку. Контрольная группа получала инъекции с PBS.

Схемы дозирования для введения AD-57928

Исследуемый объект	1 неделя		2-6 недели	
	Доза насыщения (мг/кг)	Общая доза (мг/кг)	Поддерживающая доза (мг/кг)	Общая недельная доза (мг/кг)
PBS	5x	0	2x	0
AD-57928	5x2	10	2x2	4
AD-57928	5x2	10	1x2	2
AD-57928	5x1	5	2x1	2
AD-57928	5x1	5	1x1	1
AD-57928	5x0,5	2,5	2x0,5	1
AD-57928	5x0,5	2,5	1x0,5	0,5

Сыворотку собирали за 3 дня до введения первой дозы и в 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 52, 59 и 65 день после первой дозы. Уровни белка PCSK9 в сыворотке оценивали при помощи анализа ELISA. Результаты показаны на фиг. 6, 7 и 8.

Снижение уровней сывороточного белка hPCSK9 наблюдали через 72 ч после первой дозы, и оно продержалось до 38 дня. Введение AD-57928 на уровне доз насыщения 5x2 мг/кг, 5x1 мг/кг и 5x0,5 мг/кг приводило к ~90%, ~70% и ~60% снижению уровней сывороточного белка hPCSK9, соответственно (см. фиг. 6-8). В группе, которой вводили дозы используя 2x схему дозирования для поддержания, сниженные уровни hPCSK9 продержались на 1 неделю дольше, чем в группе, которой вводили дозы, используя 1x схему дозирования для поддержания, и вернулись к исходному уровню через 4 недели после последней дозы (см. фиг. 6-8).

Пример 5. Фосфотиоатное титрование.

Для того, чтобы определить эффект количества и положения фосфотиоатных модификаций на способность dsRNA ингибировать экспрессию PCSK9, было получено и исследовано некоторое количество siRNA, основанных на исходных последовательностях AD-57928, AD-53806 и AD-53830, которые показаны в табл. 9. Для того чтобы определить, является ли любая из siRNA более эффективной в отношении сайленсинга PCSK9, чем AD-57928, трансгенным по PCSK9 мышам вводили разовую дозу 0,3 мг/кг siRNA из табл. 9 и через 72 ч после введения дозы уровни белка PCSK9 определяли при помощи анализа ELISA. Результаты, показанные на фиг. 9, свидетельствуют о том, что AD-57928 неожиданно эффективно в отношении сайленсинга PCSK9. AD-58893, AD-58894, AD-58896, AD-58897, AD-58898 и AD-58899 также были способны осуществлять сайленсинг PCSK9 по сравнению с контролем.

Таблица 9

Использованные в эксперименте с фосфотиоатным титрованием siRNA

ID дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Химическая структура
AD-57928	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1557	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1567	TOFFEE с 6 PS и 3OMe на 3'-конце AS
AD-58893	CfsuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1558	asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgasa	1568	TOFFEE с 3 внешними PS
AD-	CfusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUf	1559	aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsa	1569	TOFFEE с 3

58894	L96		a		внутренними PS
AD-58895	CfuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1560	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1570	TOFFEE только с 4 PS в антисмысловой нити
AD-58896	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1561	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaa	1571	TOFFEE только с 2 PS в смысловой нити
AD-58897	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1562	asCfsasAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1572	TOFFEE с 9 PS
AD-58898	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1563	asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1573	TOFFEE с 10 PS
AD-58899	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1564	asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1574	TOFFEE с 11 PS
AD-58900	CfsasAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	1565	asAfsaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgscsu	1575	6PS-версия AD-53806
AD-58902	UfsusUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	1566	asAfgCfaAfaAfcAfgguCfuAfgAfaAfgsgsu	1576	6PS-версия AD-53830

Пример 6. Уровни лекарственного средства в печени AD-57928 и AD-58895.

Задачей данного исследования было количественно измерить уровни siRNA в печени мышей дикого типа для того, чтобы определить соответствующие условия для тестирования в отношении уровней лекарственного средства. Использованными в эксперименте siRNA были AD-57928 и AD-58895 (которые не вызвали снижения уровня белка PCSK9 в примере 5). AD-58895 использовали в качестве препарата сравнения для определения моментов времени, при которых наблюдается различие в уровне лекарственного средства, отражающем эффективность.

Всего 33 самки мышей C57B6 использовали в эксперименте (3 мыши в группе). Этим мышам вводили разовую подкожную дозу либо AD-57928, AD-58895, либо PBS в качестве контроля. Печени собирали через 4, 24, 48, 72, 96 и 168 ч после введения дозы. Собирали два экземпляра аликвотных проб тканей на образец и концентрацию siRNA в печени измеряли с использованием специфичного к вновь сконструированной антисмысловой последовательности анализа qRT-PCR. Измеренное количество AD-57928 и AD-58895 на грамм печени в динамике показано на фигуре 10, и количество AD-57928 и AD-58895, выраженное как процент от общей теоретической дозы, показано на фиг. 11. Предел обнаружения (LOD) анализа qRT-PCR составлял ~1 нг/г печени, и анализ показал хорошую продуктивность и точную воспроизводимость дубликатов. Из результатов видно, что AD-57928 более стабильно в печени, а AD-58895 менее стабильно, и оба можно обнаружить во все моменты времени. На 7 день после введения дозы уровень AD-57928 в >100 раз превышал LOD анализа qRT-PCR, а уровень AD-58895 в >10 раз превышал LOD. В среднем имеет место >10-кратное различие концентраций AD-57928 и AD-58895 согласно их предсказанной стабильности и наблюдаемой эффективности. Моменты времени от 72 до 120 ч после введения дозы могут подходить для тестов, основанных на концентрации siRNA.

Пример 7. Оптимизация AD-57928.

Для повышения активности и стабильности AD-57928 *in vivo* получали дополнительные средства, представляющие собой иРНК, основанные на исходных последовательностях AD-57928, и исследовали их (табл. 10; "смысловые" последовательности в табл. 10 раскрыты как SEQ ID NO: 1653-1658, соответственно, в порядке встречаемости, а "антисмысловые" последовательности раскрыты как SEQ ID NO: 1659-1664, соответственно, в порядке встречаемости; те же смысловые и антисмысловые последовательности, раскрытые в табл. 10, также раскрыты на фиг. 12А).

Немодифицированные смысловые и антисмысловые последовательности для AD-60212 представляют собой следующие:

смысловая - 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU - 3' (A-122088.3; SEQ ID NO:1665); и антисмысловая - 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA - 3' (A-120190,19; SEQ ID NO:1666).

В общем, эти соединения содержали меньшее количество 2'-фтор-модификаций, и фтор-модифицированные уридины были удалены. Действенность *in vitro* этих дуплексов исследовали при помощи трансфекции клеток HeLa и Hep3b. Как показано на фиг. 12В, AD-59849, AD-59228 и AD-60212 имели значения IC₅₀, сравнимые с исходными (AD-57928).

Способность этих дуплексов сохраняться *in vivo* в печени также определяли путем введения 1 мг/кг

каждого дуплекса мышам дикого типа и определения уровня siRNA при помощи количественной PCR. Как показано на фиг. 13, все дуплексы демонстрировали большую стабильность в печени, чем исходный дуплекс, начиная с момента времени 120 ч после введения.

Способность этих дуплексов подавлять экспрессию белка PCSK9 также оценивали *in vivo* путем измерения уровней белка PCSK9, LDL, HDL, общего холестерина (Тс), триглицеридов (Тг), аланин-трансаминазы (ALT), аспаргатаминотрансферазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP) в сыворотке низших приматов (NHP). Также контролировали наличие реакции в месте инъекции. Дуплексы вводили, используя схему дозирования, которая включала "фазу насыщения" в течение первой недели (одна доза 2 мг/кг ежедневно на протяжении 5 последовательных дней, qdx5) с последующей "фазой поддержания" (три еженедельные дозы 2 мг/кг на протяжении 3 недель, qwx3), которые описаны в табл. 11 ниже.

Таблица 10

Дополнительные средства, представляющие собой иРНК

Дуплекс	ID смысловой	Смысловая	ID антисмысловой	Антисмысловая
AD-57928 (parent)	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59849	A-121244	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	csusagacCfuGfuuugcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-59223	A-120188	csusagacCfuGfuuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-60212	A-122088	csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-59228	A-120197	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	A-120202	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa

Таблица 11

Схемы дозирования

Исследуемый объект	Номер группы	N	Уровень дозы (мг/кг)	Частота введения дозы	Кумулятивная доза (мг/кг)
AD-57928	1	3 самки	2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-59849	2		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-60688	3		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-59223	4		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-60212	5		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-59228	6		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
Кровь: дни: -9, -6, -3, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 42, 49, 56, 63 (первая доза, 1 день) Наблюдение за местом инъекции: Да Показатели: белок PCSK9, LDL, HDL, Тс, Trig, ALT, AST, ALP					

Как показано на фиг. 14А и 14В, для всех соединений, за исключением AD-60688, сайленсинг PCSK9 достигал более 80%, и у отдельных животных в группе с AD-60212 сайленсинг PCSK9 достигал более 90%. На фиг. 15 показано, что при отсутствии статина для всех соединений, за исключением AD-60688, снижение уровня холестерина LDL достигало 60%, а у отдельных животных в группе с AD-59223 снижение уровня холестерина LDL достигало вплоть до 77%. На удивление, и как показано на фиг. 18, указанные средства продолжали снижать уровень холестерина в течение 46 дней после последней дозы указанных средств. Даже более удивительно, и как показано на фиг. 19, AD-60212 и AD-59849 продолжали снижать уровень холестерина LDL вплоть до 60%, по меньшей мере до 120 дней (93 дней после

последней дозы) дольше, чем любое действие, наблюдаемое для средства для RNAi *in vivo*, что указывает на то, что после фазы насыщения эти соединения можно вводить с частотой один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев на протяжении фазы поддержания.

Пример 8. Получение дополнительных основанных на AD-57928 последовательностей к PCSK9.

Получали дополнительные средства, представляющие собой иРНК, основанные на исходных последовательностях AD-57928 (см. табл. 12 ниже), и исследовали *in vitro* на действенность при помощи трансфекции клеток HeLa и Hep3В этими средствами. Значения IC₅₀ для этих средств показаны в табл. 13.

Таблица 12

Последовательности к PCSK9						
ID	Смысловая		SEQ ID	Антисмыс		SEQ ID
дуплекса	нить	Смысловая (от 5' к 3')	NO:	ловая	Антисмысловая (от 5' к 3')	NO:
AD-						
57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1577	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1605
AD-60928.1	A-122701.2	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgAfl96	1578	A-122702.2	usCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1606
AD-60929.1	A-122703.2	GfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1579	A-122704.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfcusu	1607
AD-60930.1	A-122705.2	GfsasAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1580	A-122706.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuUfcsusu	1608
AD-60931.1	A-122707.3	GfsasAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1581	A-122708.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcsusu	1609
AD-60932.1	A-122707.4	GfsasAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1582	A-122709.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcsasa	1610
AD-60933.1	A-122710.2	CfsasUfcAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1583	A-122711.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuGfaUfgsasa	1611
AD-60934.1	A-122712.2	CfsusUfcUfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1584	A-122713.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfaGfaAfgsasa	1612
AD-60927.1	A-122714.2	CfsusAfcUfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1585	A-122715.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgCfaGfuAfgsasa	1613
AD-60906.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1587	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1615
AD-60907.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1588	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1616
AD-60908.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1589	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1617
AD-60909.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1590	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1618
					asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afg	
AD-60910.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1591	A-122313.1	sasa	1619
		Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60911.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1592	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1620
		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60912.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1593	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1621
		Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60913.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1594	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1622
AD-60914.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1595	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1623
		Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60915.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1596	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1624
AD-						
57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1597	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1625
		Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60916.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1598	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1626
		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60918.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1600	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1628
		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60919.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1601	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1629
		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60920.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1602	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1630
		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)				
AD-60921.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1603	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1631
		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)			asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afg	
AD-60922.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1604	A-122313.1	sasa	1632

Таблица 13
Значения IC₅₀ для средств, представляющих собой иРНК,
определенных в табл. 12

ID дуплекса	HeLa, IC ₅₀ (нМ)	Hep3b, IC ₅₀ (нМ)
AD-57928,47	0,0026	0,0005
AD-60928,1	0,0000	0,0009
AD-60929,1	0,0010	0,0027
AD-60930,1	0,0055	0,0019
AD-60931,1	0,0028	0,0019
AD-60932,1	0,0039	0,0036
AD-60933,1	0,0349	0,1518
AD-60934,1	0,2115	0,5420
AD-60927,1	>10	-
AD-57928,45	<3,57225e-005	0,0007
AD-60906,1	0,0048	0,0007
AD-60907,1	0,0001	<3,57225e-005
AD-60908,1	0,0003	0,0072
AD-60909,1	-	0,0142
AD-60910,1	0,0001	0,0030
AD-60911,1	0,0955	0,1935
AD-60912,1	0,1834	0,4106
AD-60913,1	0,2693	0,5715
AD-60914,1	0,2292	0,4319
AD-60915,1	0,2069	0,3185
AD-57928,45	0,0057	0,0027
AD-60916,1	0,0802	0,2040
AD-60917,1	0,1420	0,0976
AD-60918,1	0,4101	0,3268
AD-60919,1	0,3202	0,5143
AD-60920,1	0,5199	0,5978
AD-60921,1	0,7969	2,0875
AD-60922,1	1,1078	1,0307

Пример 9. Эффективность повторной дозы AD-57928.

Эффективность повторной дозы AD-57928 в подавлении экспрессии белка PCSK9 оценивали *in vivo* путем измерения уровней белка PCSK9, LDL, HDL, общего холестерина (Тс), триглицеридов (Тг), аланин-трансаминазы (ALT), аспартатамино-трансферазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP) в сыворотке низших приматов (NHP). Также контролировали наличие реакции в месте инъекции. Дуплексы AD-57928 вводили подкожно с применением схем дозирования, описанных в табл. 14 ниже. Группам из 5 животных повторно вводили разовую дозу 25 мг/кг на 92 день. Одной дополнительной группе животных вводили разовую дозу 25 мг/кг. "2xw" означает два раза в неделю; "q2w" означает один раз каждые две недели; и "q1w" означает один раз в неделю.

Схемы дозирования

Исследуемый объект	Номер группы	N	Уровень дозы (мг/кг)	Частота введения дозы	Кумулятивная доза (мг)
AD-57928	1	3 самки	1	2хw, 12 доз	12
	2		2	2хw, 12 доз	24
	3		1	q2w, 6 доз	6
	4		2	q2w, 6 доз	12
	5		0,5	q1w, 6 доз	3
	6		1	q1w, 10 доз	10
	7		2	q1w, 10 доз	20

Кровь: дни -9, -6, -3, 1 (предварительно отобранная кровь), 3-129 (эффективность в образцах крови)

Наблюдение за местом инъекции: да

Показатели: белок PCSK9, LDL, HDL, Tc, Trig, ALT, AST, ALP

Как показано на фиг. 14А и 14В, для всех соединений, за исключением AD-60688, сайленсинг PCSK9 достигал более 80%, и у отдельных животных в группе с AD-60212 сайленсинг PCSK9 достигал более 90%. На фиг. 15 показано, что при отсутствии статина для всех соединений, за исключением AD-60688, снижение уровня холестерина LDL достигало 60%, а у отдельных животных в группе с AD-59223 снижение уровня холестерина LDL достигало вплоть до 77%.

Как показано на фиг. 16А, наиболее эффективным режимом для снижения LDL был режим с введением два раза в неделю (2хw), при котором снижение уровней LDL достигало примерно 60%. Та же кумулятивная доза, вводимая реже, была менее эффективной, чем режим с введением два раза в неделю. На фиг. 16В показано, что при режиме 2хw сайленсинг PCSK9 достигал более 80%.

На фиг. 17А и 17В показано, что разовая доза AD-57928 25 мг/кг характеризуется таким же началом снижения уровня LDL и PCSK9, таким же самым низким уровнем при снижении уровня PCSK9 и LDL и эквивалентной скоростью снижения уровня LDL, что и более низкая многократная доза AD-57928 2 мг/кг, вводимая два раза в неделю (2хw). Из этих графиков также видно, что существует тенденция к более быстрому снижению уровня PCSK9 при разовой дозе 25 мг/кг, и что для разовой дозы 25 мг/кг восстановление как уровней PCSK9, так и уровней LDL начинается примерно через 20 дней после достижения самого низкого уровня (7 день). Самый низкий уровень для разовой дозы 25 мг/кг наблюдали на 7 день.

Пример 10. Переносимость оптимизированных средств, представляющих собой иРНК, AD-57928.

Дополнительные средства, представляющие собой иРНК, полученные на основании исходных последовательностей AD-57928, описанные на фиг. 12А (и в табл. 10), оценивали на переносимость на крысах. Самцам крыс подкожно вводили 225 мг/кг указанных средств, представляющих собой иРНК, на 1, 8 и 15 дни и их умерщвляли и проводили им вскрытие на 16 день (см. табл. 15). Животных каждый день наблюдали в отношении любых клинических симптомов и вес тела животных определяли перед исследованием и каждую неделю на протяжении исследования. На 16 день кровь животных оценивали гематологически на свертываемость и проводили биохимический анализ сыворотки; метаболизм лекарственного средства и фармакокинетику средств определяли с использованием образцов печени животных; и сердце, легкие (инсуфлированные), почки, печень, селезенку, яички и первое и последнее места инъекции анализировали на предмет любых изменений. Не было никаких изменений в клинических признаках, данных визуального наблюдения места инъекции, биохимическом анализе сыворотки, свертываемости или микроскопической патологической анатомии печени, селезенки, легкого, сердца или яичек. В табл. 16 представлены обобщенные данные по массе печени, конечной массе тела, результаты гематологических анализов и оценка тяжести патологии для мест последней инъекции и почек для каждого исследованного средства.

Таблица 15

Схемы дозирования

Группа дозы	ТА	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Кол-во самцов	Схема дозирования	День Nx
1	PBS	0	5	3	SC в 1, 8 и 15 дни	16 день
2	AD-57928 (исходное)	225		3		
3	AD-59849	225		3		
4	AD-59223	225		3		
5	AD-59228	225		3		
6	AD-60688	225		3		
7	AD-60212	225		3		

Таблица 16

Обобщенные данные по переносимости

	<u>AD-57928</u> (исходное)	<u>AD-59849</u>	<u>AD-59223</u>	<u>AD-59228</u>	<u>AD-60688</u>	<u>AD-60212</u>
<u>Кол-во PS</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>13</u>	<u>6</u>	<u>6</u>
<u>Кол-во 2'F</u>	<u>21</u>	<u>15</u>	<u>12</u>	<u>21</u>	<u>9</u>	<u>12</u>

Кол-во dT	0	0	0	0	0	1
[печень] (мкг/г)	907±62	1139±160	1277±231	1999±424	1624±147	1258±286
Конечная BW (% от контроля)	-2.1%	-4.6%	-2.1%	-6.8%	-0.5%	-2.9%
16 день Общий анализ крови	Без изменений	Без изменений	↑WBC, ↑LYM, гемолиз	Без изменений	Без изменений	Без изменений
16 день, воспаление в месте последней инъекции	3/3 (1.7)	3/3 (1.3)	2/3 (1.5)	3/3 (2.3)	2/3 (1.0)	3/3 (1.3)
16 день, базофильн ые гранулы, почка	3/3 (2.0)	3/3 (2.3)	3/3 (1.0)	3/3 (2.0)	3/3 (1.3)	3/3 (1.3)

Оценка тяжести патологии: 1 = минимальная; 2 = слабая; 3 = умеренная;

BW = масса тела;

WBC = белая кровяная клетка;

LYM = лимфоциты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухцепочечной РНК_i, содержащее смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, образующую двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая цепь независимо имеет длину от 14 до 30 нуклеотидов, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG-3' (SEQ ID NO: 412), и указанное средство на основе двухцепочечной РНК_i 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 i, j, k и l независимо равен 0 или 1;

каждый p, p', q и q' независимо равен 0-6;

каждый N_a и каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, 2-20 из которых являются модифицированными нуклеотидами, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида, где каждый модифицированный нуклеотид независимо содержит нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT);

каждый N_b и каждый N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, 1-10 из которых являются модифицированными нуклеотидами, где каж-

дый модифицированный нуклеотид независимо выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT);

где средство на основе двухцепочечной РНК_i содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь;

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

каждый XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где XXX является комплементарным X'X'X', YYY является комплементарным Y'Y'Y' и ZZZ является комплементарным Z'Z'Z'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, представляющим собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

2. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где мотив YYY находится на месте расщепления смысловой цепи или вблизи него.

3. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12 и 13 антисмысловой цепи от 5'-конца.

4. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где модификации на нуклеотидах XXX отличаются от модификаций на нуклеотидах X'X'X', модификации на нуклеотидах YYY отличаются от модификаций на нуклеотидах Y'Y'Y', а модификации на нуклеотидах ZZZ отличаются от модификаций на нуклеотидах Z'Z'Z'.

5. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где модификации на нуклеотидах Y'Y'Y' отличаются от модификаций на нуклеотидах YYY.

6. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где $p' > 0$ и по меньшей мере один pp' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь.

7. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце смысловой цепи; на 5'-конце антисмысловой цепи; или на 5'-конце смысловой цепи и на 5'-конце антисмысловой цепи.

8. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.7,

где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами на 3'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами на 5'-конце; и

где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами на 5'-конце.

9. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где двухцепочечная область имеет длину 15-30 пар нуклеотидов.

10. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где двухцепочечная область имеет длину 17-23 пар нуклеотидов.

11. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где двухцепочечная область имеет длину 17-25 пар нуклеотидов.

12. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где двухцепочечная область имеет длину 23-27 пар нуклеотидов.

13. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где двухцепочечная область имеет длину 19-21 пар нуклеотидов.

14. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где двухцепочечная область имеет длину 21-23 пар нуклеотидов.

15. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где каждая цепь имеет длину 15-30 пар нуклеотидов.

16. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

17. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где область, комплементарная части мРНК, кодирующей PCSK9, содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 1666).

18. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 1665), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 1666).

19. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG-3' (SEQ ID NO: 412), и смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-AGACCUGUUUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 191).

20. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 1666), а смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO:

1665).

21. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3' (SEQ ID NO:1657), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663), где a, c, g и u являются 2'-О-метил (2'-ОМе) A, C, G и U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf являются 2'-фтор A, C, G и U, соответственно; dT-2' представляет собой дезокситимидин; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, дополнительно содержащая небуферный раствор.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, где указанный небуферный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

25. Фармацевтическая композиция по п.22, дополнительно содержащая буферный раствор.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, где буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию.

27. Средство на основе двухцепочечной РНК_i, содержащее смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, образующую двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая цепь независимо имеет длину от 14 до 30 нуклеотидов, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG-3' (SEQ ID NO: 412), и указанное средство на основе двухцепочечной РНК_i представлено формулой IIIa:

смысловая: 5' n_p-N_a-Y Y Y -N_a-n_q 3'

антисмысловая: 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5' (IIIa)

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

каждый p, q и q' независимо равен 0-6;

n_p'>0 и по крайней мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

каждый N_a и каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, 1-10 из которых являются модифицированными нуклеотидами, где каждый модифицированный нуклеотид независимо выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT);

каждый YYY и Y'Y'Y' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где модификации представляют собой 2'-О-метильные или 2'-фторные модификации;

где YYY является комплементарным Y'Y'Y';

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

28. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.27, где мотив YYY находится на месте расщепления смысловой цепи или вблизи него.

29. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждый N_a и каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида.

30. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждый N_a и каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида, где модификации на нуклеотидах независимо выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT).

31. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждый N_b и каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов.

32. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждый N_b и каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов, где модификации на нуклеотидах независимо выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT).

33. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

34. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи модифицированы.

35. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи модифицированы, и где модификации на нуклеотидах независимо выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT).

36. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где Y-нуклеотиды содержат 2'-О-метильную модификацию, а Y'-нуклеотиды содержат 2'-фтор-модификацию.

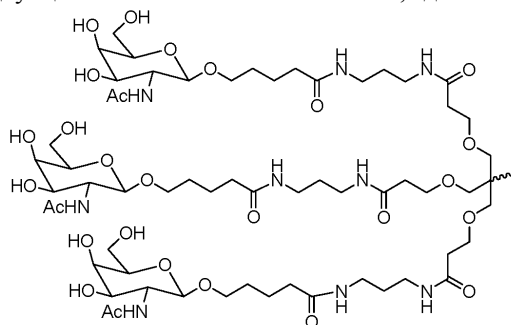
37. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждая цепь имеет длину от 19 до 25 нуклеотидов.

38. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждая цепь имеет длину от 19 до 23 нуклеотидов.

39. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждая цепь имеет длину от 17 до 23 нуклеотидов.

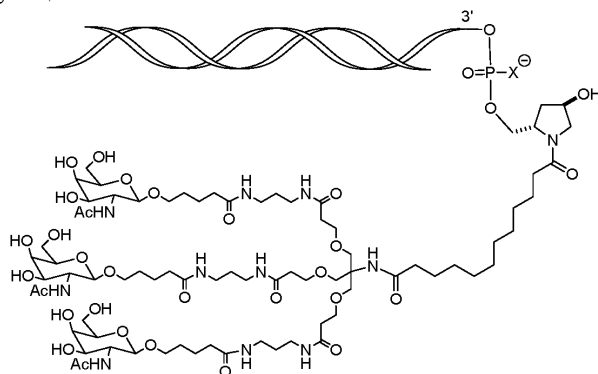
40. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где каждая цепь имеет длину от 21 до 25 нуклеотидов.

41. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27, где лиганд представляет собой



42. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по любому из пп.1-27, где лиганд присоединен к 3'-концу смысловой цепи.

43. Средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.42, где средство РНК_i конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме



где X представляет собой O или S.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе двухцепочечной РНК_i по п.27.

45. Способ ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, где способ включает:

(a) приведение клетки в контакт со средством на основе двухцепочечной РНК_i по п.1 или 27 или с фармацевтической композицией по п.22 или 44; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления мРНК-транскрипта гена PCSK9, таким образом ингибируя экспрессию гена PCSK9 в клетке.

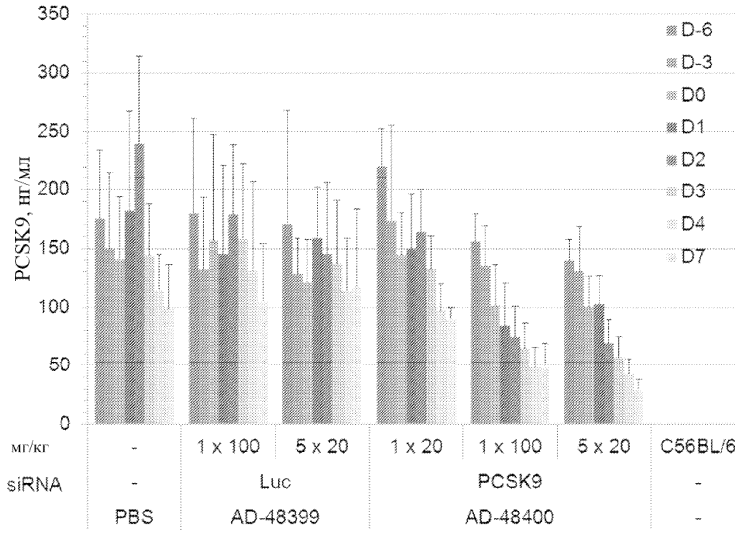
46. Применение терапевтически эффективного количества средства на основе двухцепочечного агента РНК_i по п.1 или 27 или фармацевтической композиции по п.22 или 44 для лечения пациента с липидемией, опосредованной экспрессией PCSK9.

47. Применение по п.46, где пациентом является человек.

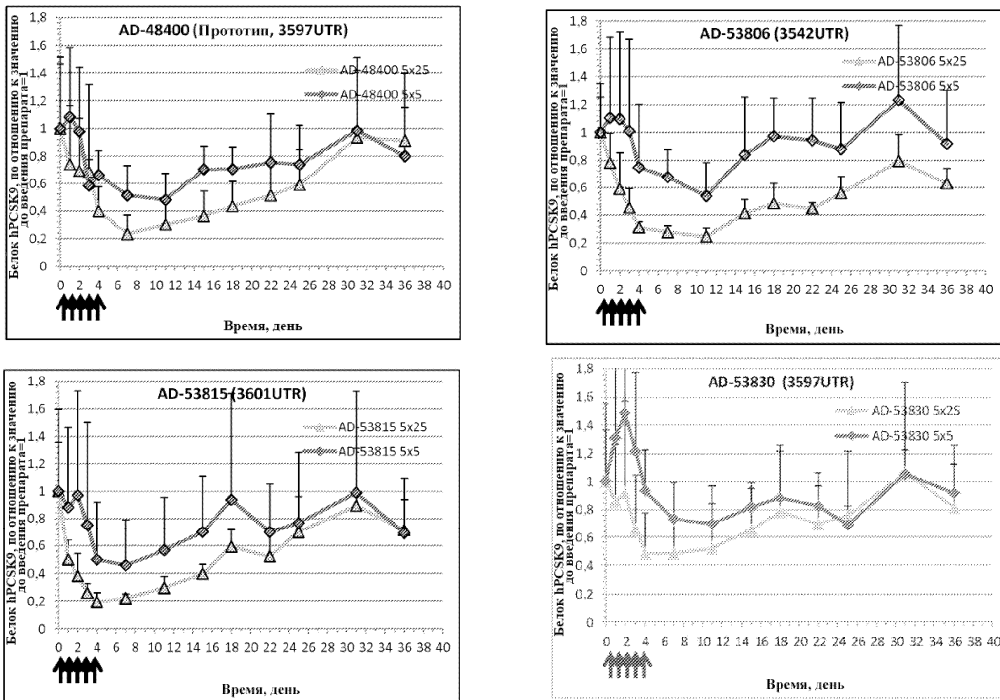
48. Применение по п.47, где у человека имеется гиперхолестеринемия.

49. Применение по п.46, где средство на основе двухцепочечной РНК_i предназначено для введения в двух или более дозах.

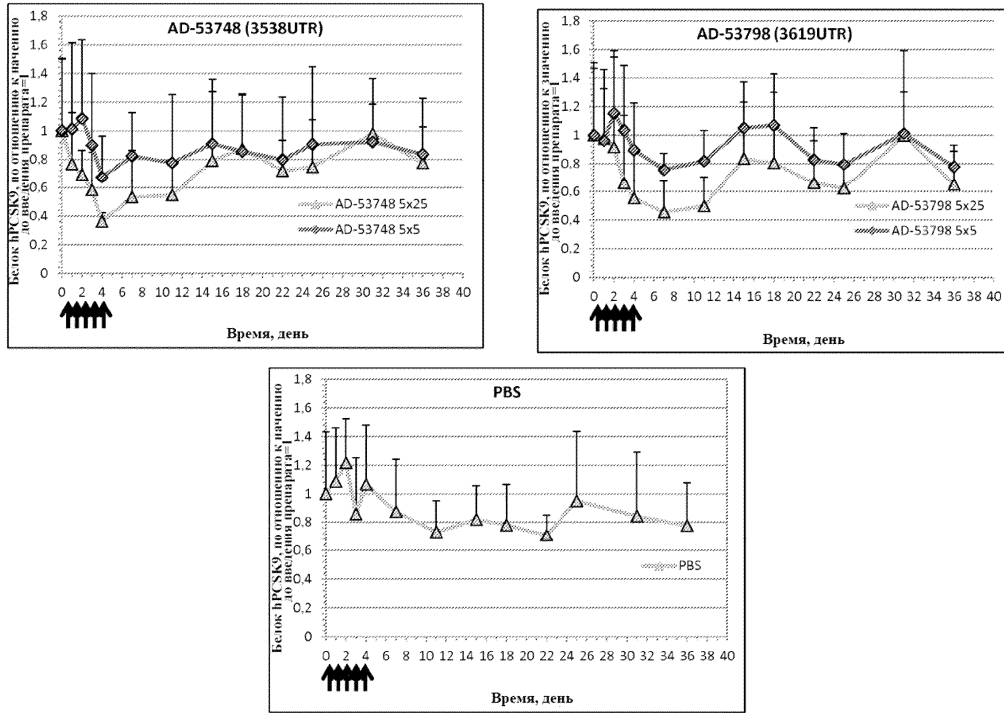
50. Применение по п.46, где средство на основе двухцепочечной РНК_i или фармацевтическая композиция предназначены для введения пациенту подкожно или внутривенно.



Фиг. 1



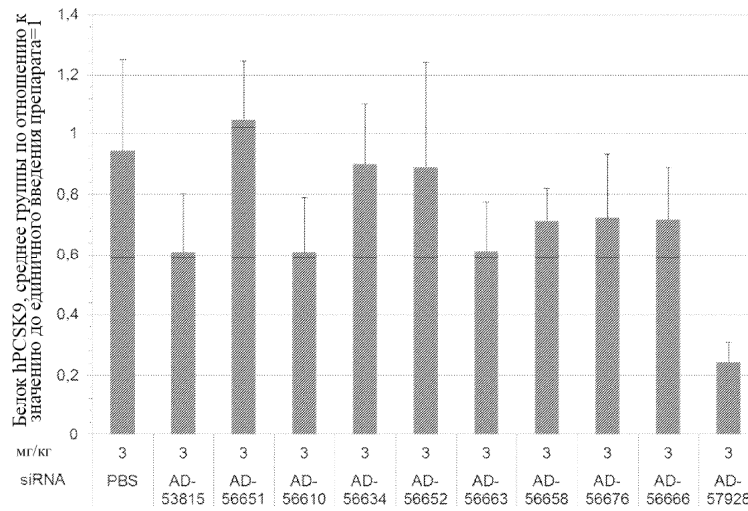
Фиг. 2А



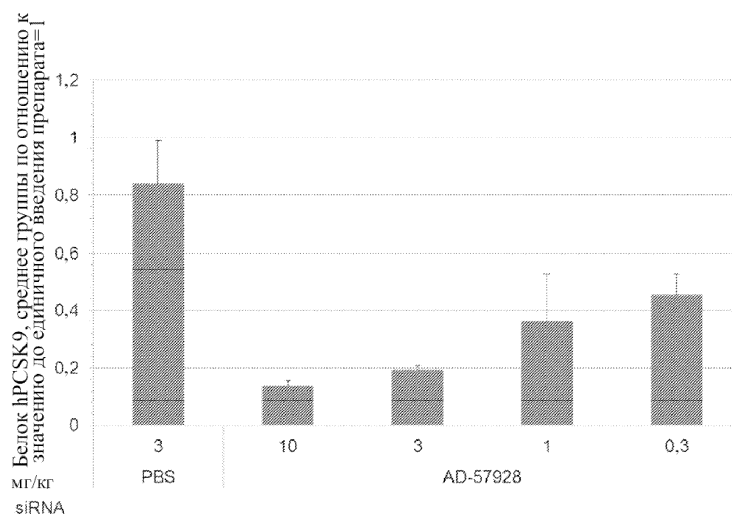
Фиг. 2В

Дуплекс	Смысловая	АС	Химическая структура		
AD-53815.5	A-110695.11	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-109545.18	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23 (исходный)
AD-56651.1	A-115523.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115524.1	(iA)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	21/23 + инвертированное основание
AD-56610.1	A-115523.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115525.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	21/23 + инвертированное основание
AD-56634.1	A-115529.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115530.1	AbCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	21/23 + L-сахар
AD-56652.1	A-115533.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfl96	A-115532.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	21/23 + L-сахар
AD-56663.1	A-115552.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuuuUfgUfl96	A-115553.1	aCfaAfAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23
AD-56658.1	A-115564.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfgUfl96	A-115565.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23
AD-56676.1	A-115584.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuuuUfgUfl96	A-115585.1	aCfaAfAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfgs	19/21
AD-56666.1	A-115596.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfgUfl96	A-115597.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfgs	19/21
AD-57928	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	6 PS вариант исходного

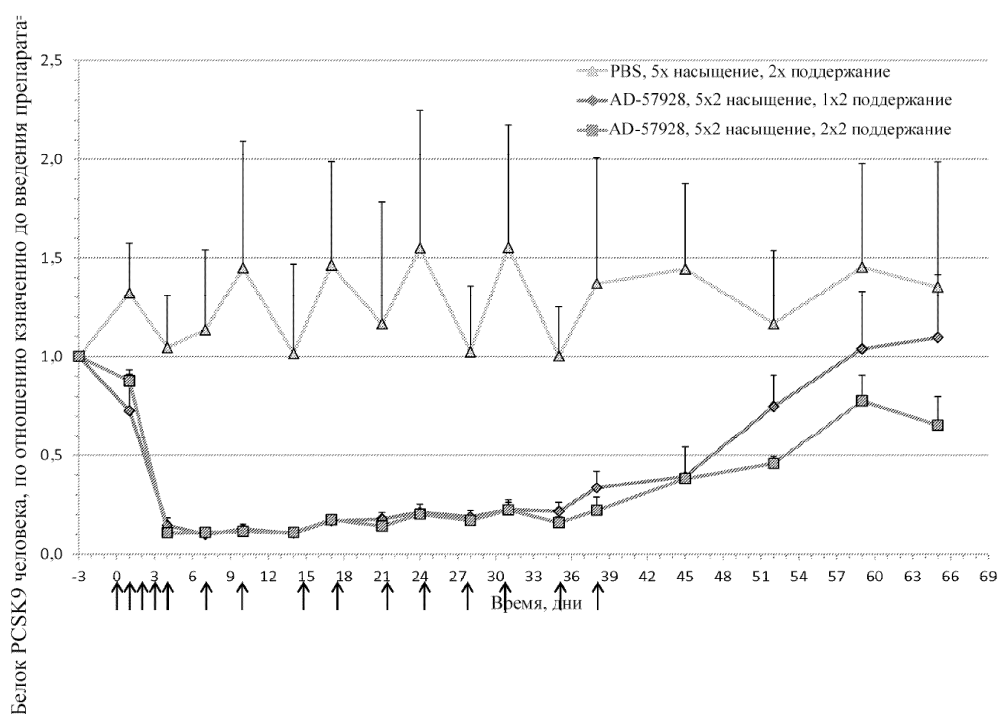
Фиг. 3



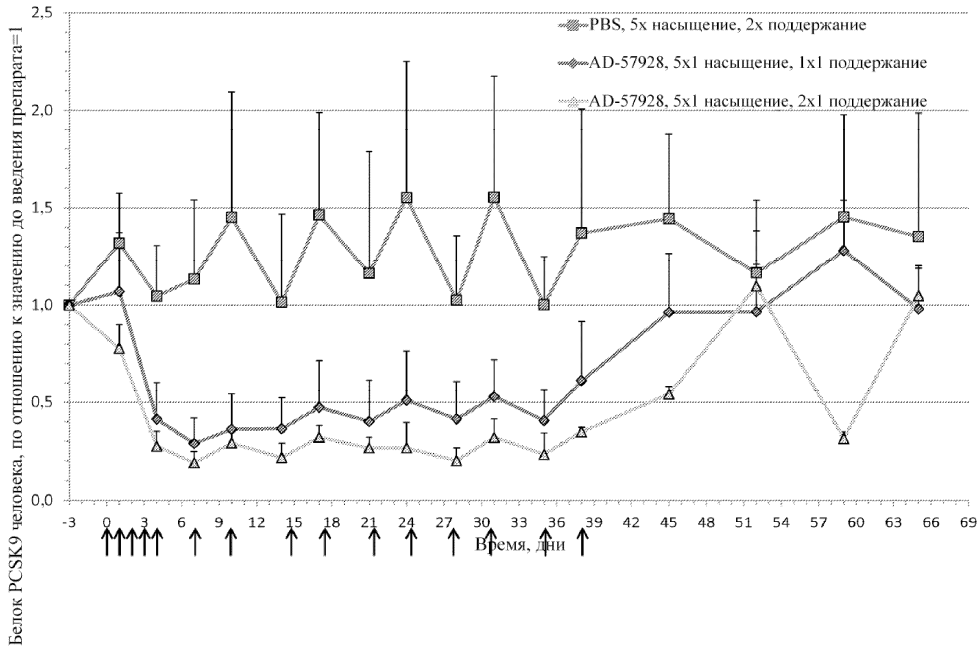
Фиг. 4



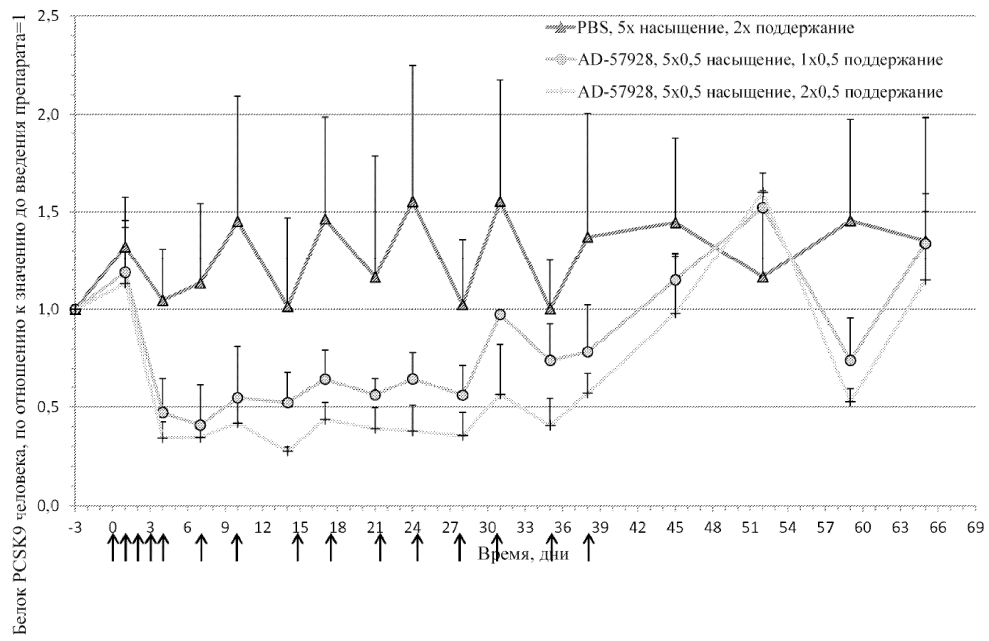
Фиг. 5



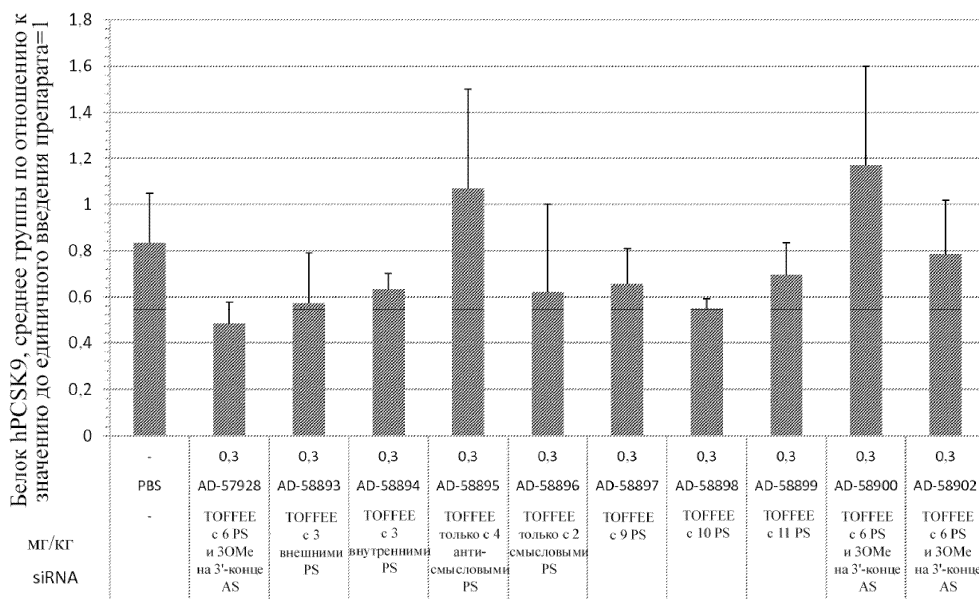
Фиг. 6



Фиг. 7

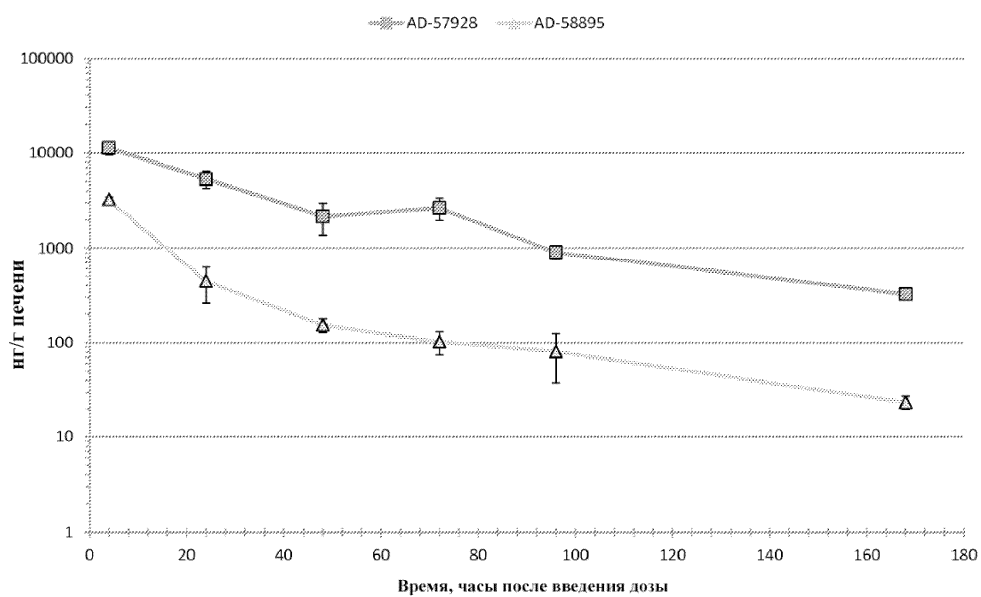


Фиг. 8

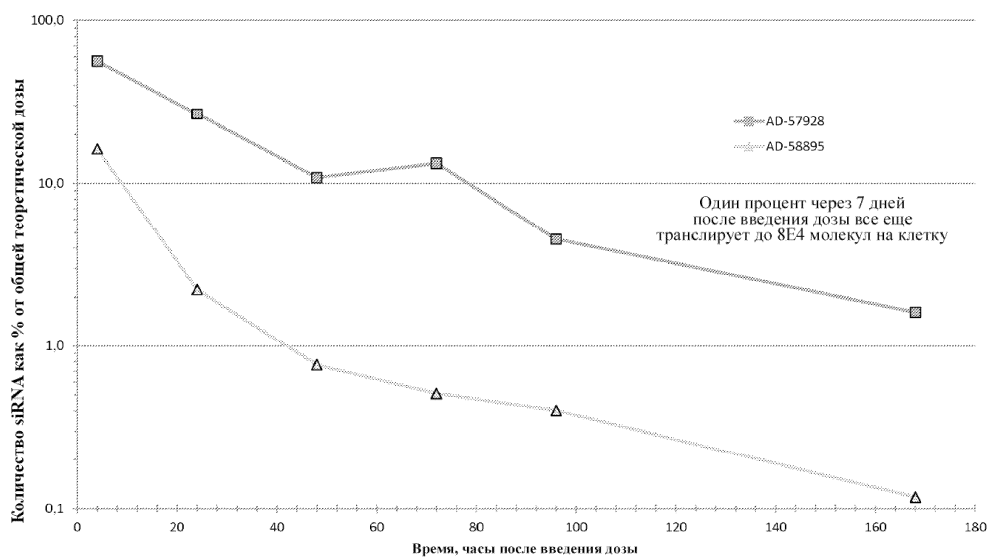


Фиг. 9

Концентрация siRNA в печени
(среднее группы)



Фиг. 10

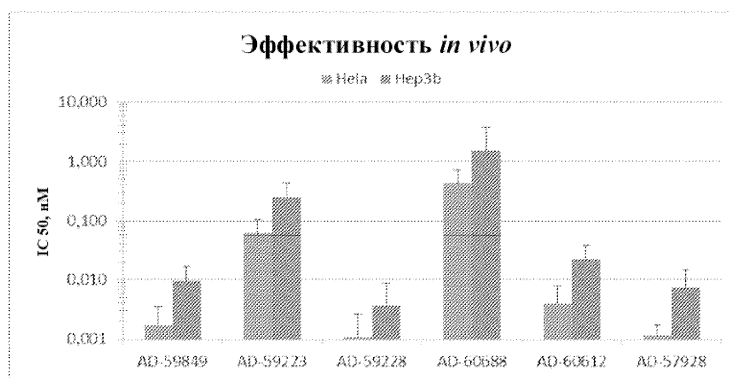


Фиг. 11

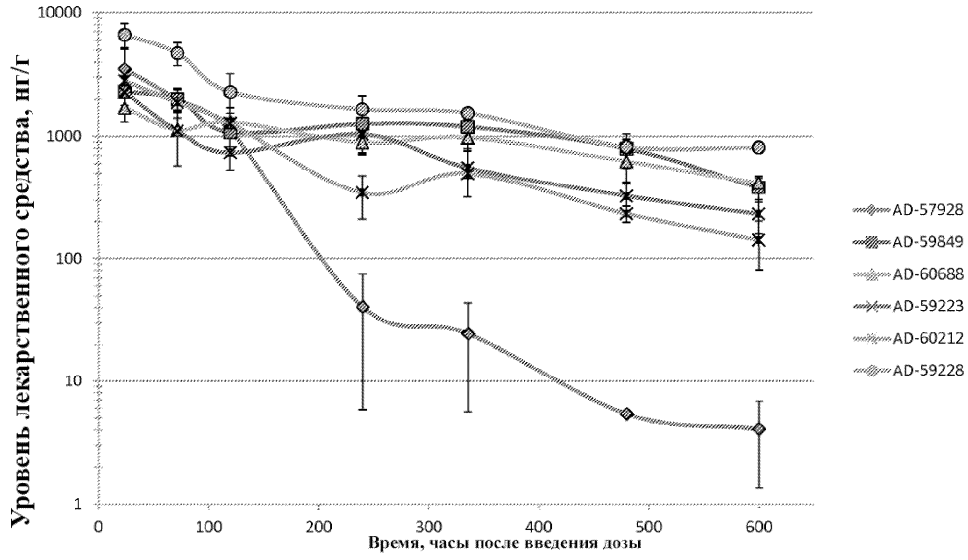
А.

Дуплекс	ID смысловой	Смысловая	ID AC	Антисмысловая
AD-57928 (исходная)	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59849	A-121244	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuugul96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuugul96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-59223	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuugul96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfucuAfgsasa
AD-60212	A-122088	csusagacCfuGfudTuugcuuuugul96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfucuAfgsasa
AD-59228	A-120197	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	A-120202	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucfsuAfgsasa

В.



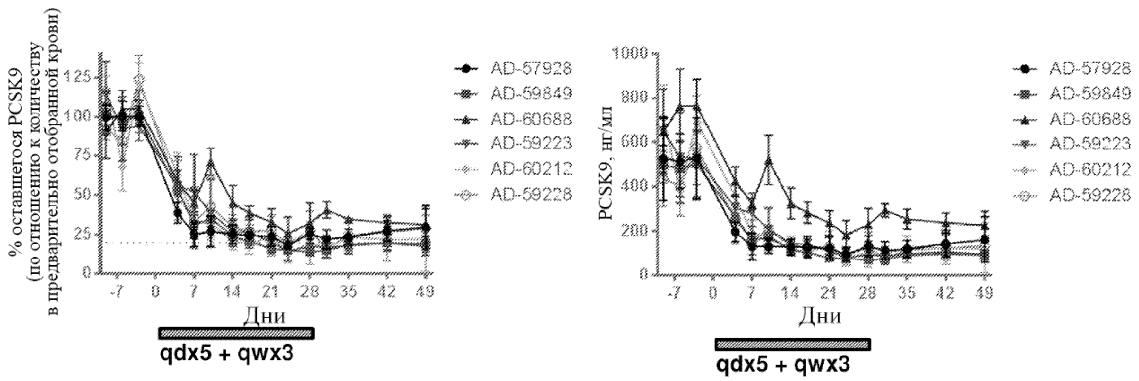
Фиг. 12



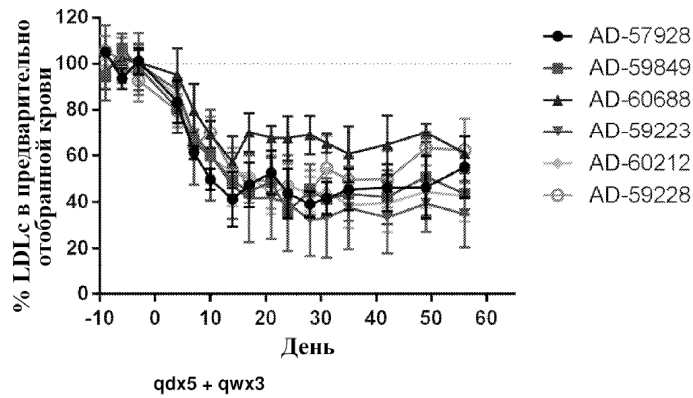
Фиг. 13

A.

B.

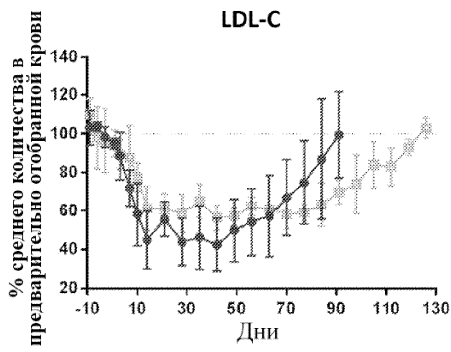


Фиг. 14

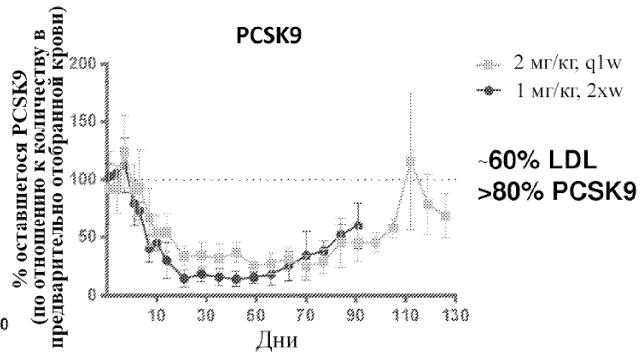


Фиг. 15

A.

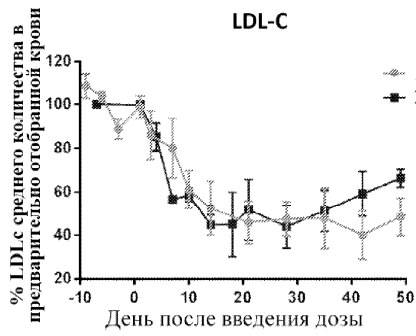


B.

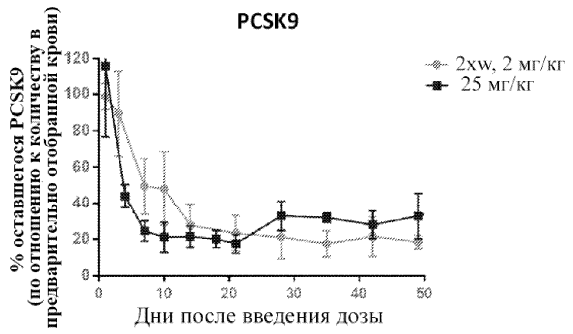


Фиг. 16

A.

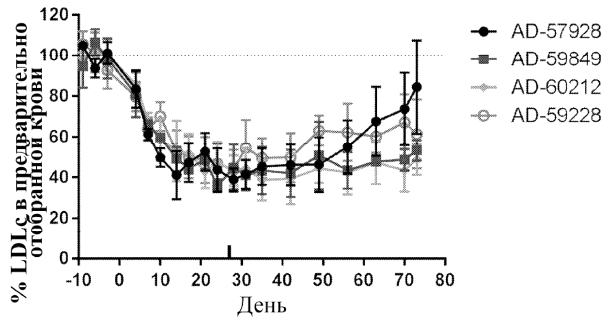


B.



Фиг. 17

LDLc в зависимости от времени



Фиг. 18

