

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047656**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.21

(21) Номер заявки
202191629

(22) Дата подачи заявки
2019.12.10

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)

(54) **КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ RNAi, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ
ЭКСПРЕССИИ PNPLA3**

(31) **62/777,714**

(32) **2018.12.10**

(33) **US**

(43) **2021.09.03**

(86) **PCT/US2019/065481**

(87) **WO 2020/123508 2020.06.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Рулифсон Ингрид, Мюррей
Джастин К., Оллманн Майкл, Хоманн
Оливер (US)**

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

(56) **US-A1-2017349903
WO-A2-2016130806
WO-A1-2017048620
WO-A2-2019118638**

(57) Изобретение относится к конструкциям для RNAi, предназначенным для снижения экспрессии гена PNPLA3. Также описаны способы применения таких конструкций для RNAi с целью лечения или предупреждения заболевания печени, представляющего собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD).

047656

B1

047656
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам модуляции экспрессии пататин-подобного фосфолипазного домена 3 (PNPLA3) в печени. В частности, настоящее изобретение относится к терапевтическим средствам на основе нуклеиновой кислоты, предназначенным для снижения экспрессии PNPLA3 посредством РНК-интерференции, и к способам применения таких терапевтических средств на основе нуклеиновой кислоты с целью лечения или предотвращения болезни печени, такой как неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD).

Предпосылки создания изобретения

Являясь частью спектра патологий печени, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) представляет собой самое распространенное хроническое заболевание печени в мире, заболеваемость которым удвоилась за последние 20 лет, и в настоящее время, по оценкам, она затрагивает приблизительно 20% населения в мире (Sattar et al. (2014), *BMJ*, 349:g4596; Loomba and Sanyal (2013), *Nature Reviews Gastroenterology & hepatology* 10(11):686-690; Kim and Kim (2017), *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 15(4):474-485; Petta et al. (2016), *Dig. Liver. Dis.* 48(3):333-342). NAFLD начинается с накопления триглицеридов в печени и определяется наличием цитоплазматических липидных капель более чем в 5% гепатоцитов у индивидуума 1) без избыточного потребления алкоголя в анамнезе и 2) у которого были исключены другие типы болезней печени (Zhu et al. (2016), *World J. Gastroenterol.* 22(36):8226-33; Rinella (2015), *JAMA*, 313(22):2263-73; Yki-Jarvinen (2016), *Diabetologia*, 59(6):1104-11). У некоторых индивидуумов накопление эктопического жира в печени, называемое стеатозом, вызывает воспаление и повреждение клеток печени, что приводит к более поздней стадии заболевания, называемой неалкогольным стеатогепатитом (NASH) (Rinella, выше). По состоянию на 2015 год у 75-100 миллионов американцев прогнозируется развитие NAFLD; при этом NASH составляет примерно 10-30% диагнозов NAFLD (Rinella, выше; Younossi et al. (2016), *Hepatology*, 64(5):1577-1586).

Пататин-подобный фосфолипазный домен 3 (PNPLA3), ранее известный как адипонутрин (ADPN) и кальций-независимая фосфолипаза A2-эпсилон (iPLA(2) ϵ), представляет собой трансмембранный белок II типа (Wilson et al. (2006), *J. Lipid Res* 47(9):1940-9; Jenkins et al. (2004), *J. Biol. Chem.* 279(47):48968-75). Первоначально идентифицированный в липоцитах как мембрано-ассоциированный белок, которым богата жировая ткань, который индуцируется во время адипогенеза у мышей, в настоящее время хорошо изучен как экспрессируемый и в других тканях, включая и печень (Wilson et al, выше; Baulande et al. (2001), *J. Biol. Chem.* 276(36):33336-44; Moldes et al. (2006). *Eur. J. Endocrinol.* 155(3):461-8; Faraj et al. (2006), *J. Endocrinol.* 191(2):427-35; Liu et al. (2004), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6):2684-9; Lake et al. (2005), *J. Lipid. Res.* 46(11):2477-87). В бесклеточных биохимических системах рекомбинантный белок PNPLA3 может проявлять либо активность триацилглицерол-липазы, либо трансацилирующую активность (Jenkins et al., выше; Kumari et al. (2012), *Cell Metab.* 15(5):691-702; He et al. (2010), *J. Biol. Chem.* 285(9):6706-15). В гепатоцитах PNPLA3 экспрессируется в эндоплазматическом ретикулуме и на липидных мембранах и преимущественно проявляет активность триацилглицеролгидролазы (He et al., выше; Huang et al. (2010), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(17):7892-7; Ruhanen et al. (2014), *J. Lipid. Res.* 55(4):739-46; Pingitore et al. (2014), *Biochim. Biophys. Acta*, 1841(4):574-80). Несмотря на отсутствие секреторного сигнала, данные указывают на то, что PNPLA3 секретируется и может быть выявлен в плазме крови человека в виде мультимеров, связанных дисульфидными связями (Winberg et al. (2014), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446(4):1114-9). Соответственно, новое терапевтическое средство, целенаправленно воздействующее на функцию PNPLA3, представляет новый подход к снижению уровней PNPLA3 и лечению болезней печени, таких как неалкогольная жировая болезнь печени.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на конструировании и получении конструкций для RNAi, которые целенаправленно воздействуют на ген PNPLA3 и снижают экспрессию PNPLA3 в клетках печени. Ингибирование экспрессии PNPLA3 по специфической последовательности является применимым для лечения или предотвращения состояний, ассоциированных с экспрессией PNPLA3, таких как заболевания печени, такие как, например, жировой гепатоз (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени (необратимое прогрессирующее рубцевание печени) или ожирение, связанное с PNPLA3. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлена конструкция для RNAi, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая является комплементарной последовательности мРНК PNPLA3. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в табл. 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления RNAi по настоящему изобретению избирательно подавляет минорные аллели PNPLA3-rs738409, PNPLA3-rs738408 и/или PNPLA3-rs738409-rs738408 по сравнению с эталонным аллелем, который не содержит данных изменений.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить конструкций для RNAi, описанных в данном документе, содержит последовательность, которая комплементарна последовательности антисмысловой нити в достаточной степени, чтобы образовать дуплексный участок длиной от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований. В этих и других вариантах осуществления каждая смысловая и

антисмысловая нити имеют длину, составляющую от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере один тупой конец. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Такие нуклеотидные липкие концы могут содержать по меньшей мере от 1 до 6 неспаренных нуклеотидов и могут быть расположены на 3'-конце смысловой нити, 3'-конце антисмысловой нити или 3'-конце как смысловой, так и антисмысловой нитей. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат липкий конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат липкий конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 3'-конце смысловой нити/5'-конце антисмысловой нити.

Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, в том числе нуклеотиды, имеющие модификации рибозного кольца, нуклеинового основания или фосфодиэфирного остова. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-модифицированных нуклеотидов. Такие 2'-модифицированные нуклеотиды могут включать 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метоксиэтил-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-аллил-модифицированные нуклеотиды, бициклические нуклеиновые кислоты (BNA), гликолевые нуклеиновые кислоты (GNA), инвертированные основания (например, инвертированный аденозин) или их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой и антисмысловой нитях конструкции для RNAi представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере одну модификацию остова, такую как модифицированную межнуклеотидную или межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь. В конкретных вариантах осуществления фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут быть расположены на 3'- или 5'-концах смысловой и/или антисмысловой нитей.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить и/или смысловая нить конструкций для RNAi по настоящему изобретению могут содержать последовательность из антисмысловой и смысловой последовательностей, представленных в табл. 1 или 2, или состоять из нее. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi могут представлять собой любые из дуплексных соединений, перечисленных в любой из табл. 1 или 2.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1D показан скрининг пяти молекул siRNA как для дозозависимого нокдауна мРНК, так и для функциональной стабильности *in vivo*.

На фиг. 2A-2G показан эффект молекул siRNA относительно PNPLA3 у мышей *in vivo*, вес печени, подтверждение экспрессии PNPLA3 у человека, содержание триглицеридов в печени, уровни TIMP1 в сыворотке крови и гистологические признаки стеатоза или воспаления.

На фиг. 3A-3G показан эффект молекул siRNA относительно PNPLA3 *in vivo*, вес печени, подтверждение экспрессии PNPLA3 у человека, содержание триглицеридов в печени, уровни TIMP1 в сыворотке крови и гистологические признаки стеатоза или воспаления.

На фиг. 4A-4D показаны способность молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, восстанавливать ассоциированные с болезнью фенотипы за счет сверхэкспрессии PNPLA3^{rs738409-rs738408}, содержание триглицеридов в печени, уровни TIMP1 в сыворотке крови и гистологические признаки стеатоза или воспаления.

На фиг. 5A-5L показана способность молекул siRNA, специфичных к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать развитие раннего фиброза.

На фиг. 6A и 6B показана полная последовательность плазмиды на основе AAV, содержащей целевые последовательности минорного аллеля PNPLA3. Часть, содержащая мышинный промотор CMV, репортерный ген люциферазы светляка и целевые последовательности, подчеркнута.

На фиг. 7A и 7B показана полная последовательность плазмиды на основе AAV, содержащей целевые последовательности эталонного аллеля PNPLA3. Часть, содержащая мышинный промотор CMV, репортерный ген люциферазы светляка и целевые последовательности, подчеркнута.

На фиг. 8 показаны иллюстративные изображения мыши, которой ввели AAV, экспрессирующий целевые последовательности минорного аллеля PNPLA3 человека (верхний ряд), по сравнению с мышью, которой ввели AAV, экспрессирующий целевые последовательности эталонного аллеля PNPLA3 человека (нижний ряд). После получения исходных изображений (первый столбец) одну и ту же молекулу siRNA вводили обоим мышам (D-2878 при 3 мг/кг). Столбцы 2-5 представляют собой изображения, полученные на 1, 2, 3 и 4 неделе соответственно. Цвета на изображениях были преобразованы в оттенки серого с применением программного обеспечения Living Image®. Более светлые участки представляют собой области с низкой общей интенсивностью потока [ф/с], по сравнению с более темными участками с

высокой интенсивностью потока [ф/с]. Относительный процент нокдауна у мышей, обработанных с помощью siRNA в каждый момент времени еженедельно, нормализованный относительно мышей, обработанных средой-носителем, изображен во вставке (ряды 2 и 4).

На фиг. 9 показан пример молекулы siRNA, D-2419, демонстрирующей как дозозависимый, так и аллель-селективный нокдаун мРНК и функциональной эффективности *in vivo*.

(A) Молекулу siRNA, D-2419, вводили при 3,0 и 10,0 миллиграммах на килограмм веса тела подкожно в область живота мыши.

(B) Данные представляют собой средний относительный процент нокдауна мРНК и стандартную ошибку среднего для аллеля PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека по сравнению с PNPLA3^{WT}, установленным в контрольной группе, обработанной средой-носителем.

(C) Ткани печени, выделенные из группы, получавшей лечение в течение двух недель, подвергали обработке для определения содержания триглицеридов с целью оценки функциональной эффективности.

(D) Для контроля эффективной GalNAc-опосредованной доставки siRNA D-2787, siRNA, перекрестно реагирующую с HPRT и Hprt человека и мыши соответственно, доставляли при 10 мг/кг и ткани печени собирали через две недели. Данные представляют собой копии мРНК HPRT и мРНК Hprt у мышей, обработанных с помощью D-2787 (N=4), по сравнению с мышами, обработанными средой-носителем (N=5).

(E) Данные представляют собой средний относительный процент нокдауна мРНК и стандартную ошибку среднего для мРНК HPRT человека и Hprt мыши соответственно, установленные для контрольной группы, обработанной средой-носителем; все данные нормализованы относительно TBP человека.

(F) Для подтверждения экспрессии рецептора GalNAc на гепатоцитах мышей PXB® уровни мРНК Asgr1 мыши и мРНК ASGR1 человека оценивали в отсутствие и в присутствии D-2419.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на композиции и способы регуляции экспрессии гена, кодирующего белок 3, содержащий пататин-подобный фосфолипазный домен (PNPLA3). В некоторых вариантах осуществления ген может находиться внутри клетки или субъекта, такого как млекопитающее (например, человека). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат конструкции для RNAi, которые целенаправленно воздействуют на мРНК PNPLA3 и снижают экспрессию PNPLA3 в клетке или млекопитающем. Такие конструкции для RNAi являются применимыми для лечения или предотвращения разных форм заболеваний печени, таких как, например, жировой гепатоз (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени (необратимое прогрессирующее рубцевание печени) или ожирение, связанное с PNPLA3.

В 2008 году полногеномные исследования ассоциаций (GWAS), направленные на поиск несинонимичных вариаций последовательности или однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), ассоциированных с NAFLD, идентифицировали вариант PNPLA3, (rs738409[G], кодирующий I148M; который обозначают как PNPLA3-rs738409, PNPLA3-*ma* или минорный аллель PNPLA3), который достоверно ассоциирован с содержанием жира в печени. После этого первичного отчета последующие GWAS подтвердили PNPLA3-rs738409 в качестве основной генетической детерминанты NAFLD, достоверно ассоциированной с 1) повышенными уровнями сывороточного биомаркера повреждения печени, аланинаминотрансферазы (ALT), 2) заболеваемостью, прогрессирующим и тяжестью NAFLD, 3) выявляемой как у страдающих ожирением, так и у худых индивидуумов, и 4) с единственным известным SNP, который, как было установлено, достоверно ассоциирован со всеми стадиями NAFLD: стеатозом, NASH, циррозом и гепатоклеточной карциномой. Консенсус среди многочисленных GWAS указывает на то, что ассоциация PNPLA3 rs738409 с NAFLD является независимой от возраста, пола, этнической принадлежности, метаболического синдрома, индекса веса тела, инсулинорезистентности и липидов сыворотки крови. Кроме того, согласно статистическим анализам нескольких источников, примерно 50% пациентов с NAFLD являются носителями мутации PNPLA3 rs738409. Пациенты могут быть носителями гомозиготной или гетерозиготной мутации PNPLA3 rs738409. Кроме того, было обнаружено, что пациенты, имеющие мутацию PNPLA3 rs738409, также часто являются носителями мутации, отстоящей на три пары оснований от rs738408 (Tian et al. (2010), Nature Genetics, 42:21-23). Таким образом, пациент может иметь минорный аллель PNPLA3-rs738409, минорный аллель PNPLA3-rs738408 или мутацию в двух минорных аллелях (PNPLA3-*dma*) PNPLA3-rs738409-rs738408.

Исследователи разработали мышинные модели для изучения функции PNPLA3 *in vivo*. На сегодняшний день не было выявлено детектируемого метаболического фенотипа, связанного с дефицитом Pnpla3 или сверхэкспрессией Pnpla3. И напротив, экспрессия Pnpla3^{I148M} как у трансгенных мышей, так и у мышей с соответствующим нокином вызвала повышение уровня печеночных триглицеридов, подобное наблюдаемому при NAFLD. Таким образом, в совокупности данные, полученные на мышинной модели *in vivo*, указывают на экспрессию мутантной формы белка Pnpla3^{I148M}, а не на сверхэкспрессию белка дикого типа в качестве фактора, способствующего развитию фенотипа заболевания. Эти наблюдения, помимо высокой частоты минорных аллелей у индивидуумов, страдающих NAFLD, и преобладающей связи с заболеванием, подчеркивают значение PNPLA3-rs738409 в качестве основной терапевтической мишени при NAFLD.

РНК-интерференция (RNAi) представляет собой процесс введения экзогенной РНК в клетку, который приводит к специфической деградации мРНК, кодирующей целевой белок, с последующим снижением экспрессии белка. Достижения как в области технологии RNAi, так и в области доставки в печень, а также растущие положительные результаты применения средств терапии на основе RNAi, предполагают, что RNAi представляет собой убедительное средство терапевтического воздействия на NAFLD путем прямого целенаправленного воздействия на PNPLA3I148M. Многочисленные GWAS указывают на наличие дозозависимого эффекта PNPLA3 rs738409 в отношении заболеваемости, прогрессирования и тяжести течения NAFLD (GWAS); наблюдалась тенденция к удвоению, если не большему увеличению, отношения шансов для носителей гомозиготного генотипа по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа, но при этом отношение шансов было по меньшей мере в два раза больше для индивидуумов с гетерозиготным генотипом по сравнению с индивидуумами с аллелем дикого типа. Таким образом, сайленсинг PNPLA3, использующий специфичность распознавания аллелей, может быть как потенциальным средством для снижения уровней печеночных триглицеридов у носителей PNPLA3I148M, так и представлять вариант, при котором гетерозиготные носители могут получить пользу без сайленсинга аллеля дикого типа. В соответствии с этим авторы настоящего изобретения определили короткие интерферирующие РНК (siRNA), специфичные к SNP PNPLA3I148M, и продемонстрировали доказательство концепции *in vitro*. Используя обе линии клеток гепатомы, Hep3B (гомозиготную по эталонному аллелю, PNPLA3I148I) и HEPG2 (гомозиготную по минорному аллелю, PNPLA3I148M), авторы настоящего изобретения идентифицировали последовательности siRNA, способные специфично подавлять экспрессию гена PNPLA3I148M. Ингибиторный эффект данных последовательностей был подтвержден скринингом на клетках яичника китайского хомячка (CHO) со сверхэкспрессией PNPLA3I148I либо PNPLA3I148M. Используя адено-ассоциированный вирус (AAV) для достижения сверхэкспрессии *in vivo* PNPLA3I148M человека, авторы настоящего изобретения затем показали, что обработка минорными аллель-специфическими SNP не только вызывала специфическое снижение экспрессии PNPLA3I148M человека у мышей, но также в значительной степени обращала вспять накопление печеночных триглицеридов, вызванное сверхэкспрессией PNPLA3I148M человека.

Используемый в данном документе термин "конструкция для RNAi" относится к средству, содержащему молекулу РНК, которая при введении в клетку способна снижать экспрессию целевого гена (например, PNPLA3) посредством механизма РНК-интерференции. РНК-интерференция представляет собой процесс, посредством которого молекула нуклеиновой кислоты вызывает расщепление и деградацию молекулы целевой РНК (например, матричной РНК или мРНК) специфичным для последовательности образом, например через путь РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит молекулу двухнитевой РНК, содержащую две антипараллельные нити из смежных нуклеотидов, которые достаточно комплементарны друг другу, чтобы гибридизоваться с образованием дуплексного участка. Термины "гибридизовать" или "гибридизация" относятся к спариванию комплементарных полинуклеотидов, обычно с помощью водородных связей (например, связи Уотсона-Крика, Хугстина или обратной водородной связи Хугстина) между комплементарными основаниями в двух полинуклеотидах. Нить, содержащую участок, имеющий последовательность, которая по сути комплементарна целевой последовательности (например, целевой мРНК), называют "антисмысловой нитью".

Термин "смысловая нить" относится к нити, которая включает участок, который по сути комплементарен участку антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может содержать участок, имеющий последовательность, которая по сути идентична целевой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлено средство для RNAi, направленное на PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено средство для RNAi, которое связывается с сайтом rs738409 PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено средство для RNAi, которое связывается с сайтом rs738408 PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено средство для RNAi, которое связывается как с сайтом rs738409, так и с сайтом rs738408 PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено средство для RNAi, которое предпочтительно связывается с rs738409 PNPLA3, а не с нативной последовательностью PNPLA3 (PNPLA3-ref). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено средство для RNAi, которое предпочтительно связывается с rs738408 PNPLA3, а не с последовательностью PNPLA3-ref. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено средство для RNAi, которое предпочтительно связывается с PNPLA3-dma, а не с PNPLA3-ma. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлена молекула для RNAi, которая содержит любую из последовательностей, перечисленных в табл. 1 или 2.

Молекула двухнитевой РНК может включать химические модификации рибонуклеотидов, в том числе модификации компонентов рибонуклеотидов, представляющих собой рибозный сахар, основание или остов, таких как те, которые описаны в данном документе или известны из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в двухнитевой молекуле РНК (например, siRNA, shRNA или

им подобные), охватываются термином "двухнитевая РНК" в целях настоящего изобретения.

Согласно терминологии, используемой в данном документе, первая последовательность "комплементарна" второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность, может гибридизоваться с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, с образованием дуплексного участка при определенных условиях, таких как физиологические условия. Другие такие условия могут включать умеренные или жесткие условия гибридизации, которые известны специалистам в данной области. Первая последовательность считается полностью комплементарной (комплементарной на 100%) второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность оснований, соединяется с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей без каких-либо ошибочно спаренных оснований. Последовательность является "по сути комплементарной" целевой последовательности, если эта последовательность по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарна целевой последовательности. Процент комплементарности может быть рассчитан путем деления числа оснований в первой последовательности, которые являются комплементарными основаниям в соответствующих положениях во второй или целевой последовательности, на общую длину первой последовательности. Можно также сказать, что последовательность является по сути комплементарной другой последовательности, когда при гибридизации этих двух последовательностей встречается не более 5, 4, 3, 2 или 1 ошибочно спаренных по дуплексному участку из 30 пар оснований. Как правило, если присутствуют какие-либо нуклеотидные липкие концы, как это указано в данном документе, последовательность таких липких концов не учитывается при определении степени комплементарности между двумя последовательностями. Например, смысловая нить длиной 21 нуклеотид и антисмысловая нить длиной 21 нуклеотид, которые гибридизуются с образованием дуплексного участка из 19 пар оснований с 2 нуклеотидными липкими концами на 3'-конце каждой нити, будут считаться полностью комплементарными в соответствии с термином, используемым в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления участок антисмысловой нити содержит последовательность, которая полностью комплементарна участку целевой последовательности РНК (например, мРНК PNPLA3). В таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити. В других таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая по сути комплементарна последовательности антисмысловой нити, например имея 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочно спаренных оснований в дуплексном участке, образованном смысловой и антисмысловой нитями. В определенных вариантах осуществления предпочтительно, чтобы любые ошибочно спаренные основания находились в концевых участках (например, в пределах 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-концов нитей). В одном варианте осуществления любые ошибочно спаренные основания в дуплексном участке, образованном из смысловой и антисмысловой нитей, находятся в пределах 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотидов от 5'-конца антисмысловой нити.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевой РНК могут представлять собой две отдельные молекулы, которые гибридизуются с образованием дуплексного участка, но в остальном не связаны. Такие двухнитевые молекулы РНК, образованные двумя отдельными нитями, называют "малыми интерферирующими РНК" или "короткими интерферирующими РНК" (siRNA). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат siRNA.

Если две по сути комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, эти молекулы не должны, но могут быть ковалентно связаны. Там, где две нити ковалентно соединены иным способом, чем образование непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующей дуплексную структуру, соединяющую структуру называют "линкер". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований в дуплексе равно числу нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых липких концов, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре RNAi могут содержать один или несколько нуклеотидных липких концов.

В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить, которые гибридизуются с образованием дуплексного участка, могут быть частью одной молекулы РНК, т.е. смысловые и антисмысловые нити могут быть частью самокомплементарного участка одиночной молекулы РНК. В таких случаях одиночная молекула РНК содержит дуплексный участок (также называемый как участок стебля) и участок петли. 3'-конец смысловой нити соединяется с 5'-концом антисмысловой нити непрерывной последовательностью неспаренных нуклеотидов, которые будут образовывать участок петли. Участок петли обычно имеет длину, достаточную для того, чтобы молекула РНК могла свернуться обратно так, чтобы антисмысловая нить могла образовывать пару со смысловой нитью, образуя дуплекс или участок стебля. Участок петли может содержать от приблизительно 3 до приблизительно 25, от приблизительно 5 до приблизительно 15 или от приблизительно 8 до приблизительно 12 неспаренных нуклеотидов. Такие молекулы РНК по меньшей мере частично с самокомплементарными участками обозначают как "короткие шпильковые РНК" (shRNA). В некоторых вариантах осуществления участок петли может содержать

по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 25 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления участок петли может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или меньше неспаренных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат shRNA. Длина одной по меньшей мере частично самокомплементарной молекулы РНК может составлять от приблизительно 35 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 45 до приблизительно 85 нуклеотидов или от приблизительно 50 до приблизительно 60 нуклеотидов и содержать дуплексный участок и участок петли, каждый из которых имеет длину, указанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности матричной РНК (мРНК) PNPLA3. Используемый в данном документе термин "последовательность мРНК PNPLA3" относится к любой последовательности матричной РНК, включая сплайс-варианты, кодирующие белок PNPLA3, включая варианты белка PNPLA3 или изоформы любых видов (например, мыши, крысы, нечеловекообразного примата, человека). Белок PNPLA 3 также известен как адипонутрин (ADPN) и кальций-независимая фосфолипаза A2-эпсилон (iPLA(2)ε).

Последовательность мРНК PNPLA3 также включает последовательность транскрипта, экспрессируемого в виде последовательности комплементарной ДНК (кДНК). Термин "последовательность кДНК" относится к последовательности транскрипта мРНК, экспрессируемой в виде оснований ДНК (например, гуанина, аденина, тимина и цитозина), но не оснований РНК (например, гуанина, аденина, урацила и цитозина). Таким образом, антисмысловая нить конструкции для RNAi по настоящему изобретению может содержать участок, имеющий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности мРНК PNPLA3 или последовательности кДНК PNPLA3. мРНК PNPLA3 или последовательность кДНК может включать без ограничения любую мРНК PNPLA3 или последовательность кДНК, такую как те, которые могут быть получены из эталонной последовательности NCBI NM_025225.2.

Участок антисмысловой нити может быть по сути комплементарен или полностью комплементарен по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам из последовательности мРНК PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления целевой участок последовательности мРНК PNPLA3, антисмысловая нить которого содержит комплементарный участок, может составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 16 до приблизительно 28 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 18 до приблизительно 26 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 17 до приблизительно 24 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 25 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 23 последовательных нуклеотидов или от приблизительно 19 до приблизительно 21 последовательных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления участок антисмысловой нити, содержащий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности мРНК PNPLA3, в некоторых вариантах осуществления может содержать по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в табл. 1 или 2. В других вариантах осуществления антисмысловая последовательность содержит по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18 или по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в табл. 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления смысловая и/или антисмысловая последовательность содержит по меньшей мере 15 нуклеотидов из последовательности, представленной в табл. 1 или 2, не более чем с 1, 2 или 3 ошибочно спаренными нуклеотидами.

Смысловая нить конструкции для RNAi обычно содержит последовательность, которая настолько комплементарна последовательности антисмысловой нити, что две нити гибридизуются в физиологических условиях с образованием дуплексного участка.

Термин "дуплексный участок" относится к участку в двух комплементарных или по сути комплементарных полинуклеотидах, которые образуют пары оснований друг с другом либо путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, либо посредством другого взаимодействия водородных связей, создавая дуплекс между двумя полинуклеотидами. Дуплексный участок конструкции для RNAi должен быть достаточной длины, чтобы позволить конструкции для RNAi встраиваться в механизм РНК-интерференции, например, путем взаимодействия с ферментом Dicer и/или комплексом RISC. Например, в некоторых вариантах осуществления дуплексный участок имеет длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований. Другие значения длины дуплексного участка в данном диапазоне также являются подходящими, такие как от приблизительно 15 до приблизительно 28 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 26 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 24 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 22 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 28 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 26 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 23 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 21 пары оснований, от приблизительно 19 до приблизительно 25 пар оснований, от приблизительно 19 до приблизительно 23 пар оснований или

от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований. В одном варианте осуществления дуплексный участок имеет длину от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований. В другом варианте осуществления дуплексный участок имеет длину от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит дуплексный участок от приблизительно 24 до приблизительно 30 нуклеотидов, который взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК PNPLA3, чтобы направлять расщепление целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, авторы настоящего изобретения напоминают, что длинная двухнитевая РНК, вводимая в клетки, может быть разрезана до siRNA посредством эндонуклеазы III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001), Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III, 15 осуществляет процессинг dsRNA с образованием коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пар оснований с характерными 3'-липкими концами длиной в два основания (Bernstein, et al., (2001), Nature, 409:363). Затем siRNA встраиваются в состав комплекса сайленсинга, индуцированного РНК (RISC), в котором одна или несколько хеликаз расплетают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001), Cell, 107:309). При связывании с соответствующей целевой 20 мРНК одна или несколько эндонуклеаз в составе комплекса RISC расщепляют мишень с индуцированием сайленсинга (Elbashir, et al., (2001), Genes Dev. 15:188).

Для тех вариантов осуществления, в которых смысловая нить и антисмысловая нить являются двумя отдельными молекулами (например, в том случае, когда конструкция для RNAi содержит siRNA), смысловая нить и антисмысловая нить не должны быть такой же длины, как длина дуплексного участка. Например, одна или обе нити могут быть длиннее дуплексного участка и содержать один или несколько неспаренных нуклеотидов или ошибочно спаренных нуклеотидов, фланкирующих дуплексный участок. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Используемый в данном документе термин "нуклеотидный липкий конец" относится к неспаренному нуклеотиду или нуклеотидам, которые выступают за пределы дуплексного участка на терминальных концах нитей. Нуклеотидные липкие концы обычно образуются в том случае, когда 3'-конец одной нити выступает за пределы 5'-конца другой нити или когда 5'-конец одной нити выступает за пределы 3'-конца другой нити. Длина нуклеотидного липкого конца обычно составляет от 1 до 6 нуклеотидов, от 1 до 5 нуклеотидов, от 1 до 4 нуклеотидов, от 1 до 3 нуклеотидов, от 2 до 6 нуклеотидов, от 2 до 5 нуклеотидов или от 2 до 4 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный липкий конец содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В одном конкретном варианте осуществления нуклеотидный липкий конец содержит от 1 до 4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидный липкий конец содержит 2 нуклеотида. Нуклеотиды в составе липкого конца могут представлять собой рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления липкий конец содержит динуклеотид, представляющий собой 5'-уридин-уридин-3' (5'-UU-3'). В таких вариантах осуществления динуклеотид UU может содержать рибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, например, 2'-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления липкий конец содержит динуклеотид, представляющий собой 5'-дезокситимидин-дезокситимидин-3' (5'-dTdT-3').

Нуклеотидный липкий конец может находиться на 5'-конце или 3'-конце одной или обеих нитей. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 5'-конце и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 5'-конце и на 3'-конце смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 5'-конце смысловой нити и на 5'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити.

Конструкции для RNAi могут содержать один нуклеотидный липкий конец на одном конце молекулы двухнитевой РНК и тупой конец на другом. Термин "тупой конец" означает, что смысловая нить и антисмысловая нить полностью спарены по основаниям на конце молекулы и что отсутствуют какие-либо неспаренные нуклеотиды, которые выступают за пределы дуплексного участка. В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити и тупой конец на 5'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и на 3'-конце смысловой нити. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит тупой конец на обоих концах молекулы двухнитевой РНК. В таких вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, а дуплексный участок имеет такую же длину, как смысловая и антисмысловая нити (т.е. молекула является двухнитевой по всей ее длине).

Длина каждой смысловой нити и антисмысловой нити может независимо составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 18 до приблизительно

28 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 27 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов, от приблизительно 21 до приблизительно 25 нуклеотидов или от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина каждой смысловой нити и антисмысловой нити составляет приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24 или приблизительно 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, но образуют дуплексный участок, который короче данных нитей, поэтому конструкция для RNAi содержит два нуклеотидных липки конца. К примеру, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид; (ii) дуплексный участок, который имеет длину 19 пар оснований; и (iii) нуклеотидные липкие концы из двух неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида; (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований; и (iii) нуклеотидные липкие концы из двух неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину и образуют дуплексный участок по всей их длине, поэтому на обоих липких концах двухнитевой молекулы отсутствуют нуклеотидные липкие концы. В одном таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет тупые концы и содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нити, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид; и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований. В другом таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет тупые концы и содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида; и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 23 пары оснований.

В других вариантах осуществления смысловая нить или антисмысловая нить длиннее другой нити, и при этом две нити образуют дуплексный участок, длина которого равна длине более короткой нити, поэтому конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить длиной 19 нуклеотидов; (ii) антисмысловую нить длиной 21 нуклеотид; (iii) дуплексный участок, имеющий длину 19 пар оснований; и (iv) один нуклеотидный липкий конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить длиной 21 нуклеотид; (ii) антисмысловую нить длиной 23 нуклеотида; (iii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований; и (iv) один нуклеотидный липкий конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

Антисмысловая нить конструкции для RNAi по настоящему изобретению может содержать последовательность из любой из антисмысловых последовательностей, представленных в табл. 1 или 2, или последовательность нуклеотидов 1-19 любой из данных антисмысловых последовательностей. Каждая из антисмысловых последовательностей, представленных в табл. 1 и 6, содержит последовательность из 19 последовательных нуклеотидов (первые 19 нуклеотидов, считая с 5'-конца), которая комплементарна последовательности мРНК PNPLA3, плюс последовательность нуклеотидного липкого конца, состоящего из двух нуклеотидов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 1-19 из любой из SEQ ID NO: 1-166 или 167-332.

Модифицированные нуклеотиды.

Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов. Термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, который имеет одну или больше химических модификаций нуклеозида, нуклеинового основания, пентозного кольца или фосфатной группы. Используемые в данном документе "модифицированные нуклеотиды" не охватывают рибонуклеотиды, содержащие аденозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат, уридинмонофосфат и цитидинмонофосфат, и дезоксирибонуклеотиды, содержащие дезоксиаденозинмонофосфат, дезоксигуанозинмонофосфат, дезокситимидинмонофосфат и дезоксицитидинмонофосфат. Однако конструкции для RNAi могут содержать комбинации модифицированных нуклеотидов, рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Встраивание модифицированных нуклеотидов в одну или обе нити двухнитевых молекул РНК может улучшать стабильность молекул РНК *in vivo*, например, за счет снижения восприимчивости молекул к нуклеазам и другим процессам деградации. Эффективность конструкций для RNAi в отношении снижения экспрессии целевого гена также можно повысить путем встраивания модифицированных нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды имеют модификацию рибозного сахара. Данные модификации сахара могут включать модификации в 2'- и/или 5'-положении пентозного кольца, а также модификации бициклического сахара. Термин "2'-модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, имеющему пентозное кольцо с заместителем в положении 2', отличным от H или OH. Такие 2'-модификации включают без ограничения 2'-O-алкил (например, O-C₁-C₁₀ или O-C₁-C₁₀ замещенный алкил), 2'-O-аллил (O-CH₂CH=CH₂), 2'-C-аллил, 2'-фторо, 2'-O-метил (OCH), 2'-O-метоксиэтил (O-(CH₂)₂OCH), 2'-OCF₃, 2'-O(CH₂)₂SCH, 2'-O-аминоалкил, 2'-амино (например, NH₂),

2'-О-этиламин и 2'-азидо. Модификации в 5'-положении пентозного кольца включают без ограничения 5'-метил (R или S); 5'-винил и 5'-метокси.

Термин "бициклическая модификация сахара" относится к модификации пентозного кольца, при которой мостик соединяет два атома кольца с образованием второго кольца, что приводит к образованию бициклической структуры сахара. В некоторых вариантах осуществления бициклическая модификация сахара предусматривает мостик между атомами углерода пентозного кольца в 4'- и 2'-положениях. Нуклеотиды, содержащие сахарный фрагмент с бициклической модификацией сахара, используются в данном документе как термин "бициклические нуклеиновые кислоты" или BNA. Иллюстративные бициклические модификации сахара включают без ограничения α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA); β -D-метиленокси (4'-CH₂-O-2') BNA (также называемую закрытой нуклеиновой кислотой или LNA); этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; аминоокси (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA; оксиамино (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; метил (метиленокси) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (также называемую конформационно затрудненную этилом или cEt); метилен-тио (4'-CH₂-S-2') BNA; метилен-амино (4'-CH₂-N(R)-2') BNA; метилкарбоциклическую (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA; пропиленкарбоциклическую (4'-(CH₂)₃-2') BNA и метокси (этиленокси) (4'-CH(CH₂OMe)-O-2') BNA (также называемую конформационно затрудненной MOE или cMOE). Эти и другие нуклеотиды с модифицированным сахаром, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патенте США № 9181551, в публикации патента США № 2016/0122761 и у Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19, 937-954, 2012, при этом все они включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотидов, 2'-О-аллил-модифицированных нуклеотидов, бициклических нуклеиновых кислот (BNA) или их комбинации. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации.

Как смысловые, так и бессмысловые нити конструкций для RNAi могут содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше модифицированных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления бессмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше модифицированных нуклеотидов. В других вариантах осуществления все нуклеотиды в бессмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых других вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити и все нуклеотиды в бессмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В этих и других вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды могут представлять собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления все пиримидиновые нуклеотиды, предшествующие аденозиновому нуклеотиду в смысловой нити, бессмысловой нити или в обеих нитях, представляют собой модифицированные нуклеотиды. Например, там, где в любой нити появляется последовательность 5'-CA-3' или 5'-UA-3', нуклеотиды цитидин и уридин представляют собой модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления все пиримидиновые нуклеотиды в смысловой нити являются модифицированными нуклеотидами (например, 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами), а 5'-нуклеотиды во всех случаях последовательности 5'-CA-3' или 5'-UA-3' в бессмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами (например, 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами). В других вариантах осуществления все нуклеотиды в дуплексном участке представляют собой модифицированные нуклеотиды. В таких вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды предпочтительно представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

В ряде вариантов осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец, нуклеотиды в липком конце могут представлять собой рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды. В одном варианте осуществления нуклеотиды в липком конце представляют собой дезоксирибонуклеотиды, например, дезокситимидин. В другом варианте осуществления нуклеотиды в липком конце представляют собой модифицированные нуклеотиды. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в липком конце представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-метоксиэтил-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут также содержать одну или несколько

модифицированных межнуклеотидных связей. Используемый в данном документе термин "модифицированная межнуклеотидная связь" относится к межнуклеотидной связи, отличной от природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфорсодержащую межнуклеотидную связь, такую как сложную фосфотриэфирную, сложную аминоалкилфосфотриэфирную, алкилфосфонатную (например, метилфосфонатную, 3'-алкиленфосфонатную), фосфинатную, фосфорамидатную (например, 3'-аминофосфорамидатную и аминоалкилфосфорамидатную), фосфоротиоатную (P=S), хиралфосфоротиоатную, фосфородитиоатную, тионофосфорамидатную, тионоалкилфосфонатную, сложную тионоалкилфосфотриэфирную и боранофосфатную. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой сложную 2'-5'-фосфодиэфирную связь. В других вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой нефосфорную межнуклеотидную связь и, таким образом, может упоминаться как модифицированная межнуклеозидная связь. Такие нефосфорсодержащие связи включают без ограничения морфолиновые связи (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые связи (-O-Si(H)₂-O-); сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые связи; формацетильные и тиоформацетильные связи; алкеносодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленметиленовые (-CH₂-N(CH)-O-CH₂-) и метиленидразиноновые связи; сульфатные и сульфонамидные связи; амидные связи и другие, имеющие смешанные составные части, содержащие N, O, S и CH₂. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой пептидную связь (например, аминоэтилглицин) для создания пептидной нуклеиновой кислоты или PNA, такой как описанной в патентах США № 5539082; 5714331 и 5719262. Другие подходящие модифицированные межнуклеотидные и межнуклеозидные связи, которые могут быть использованы в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патентах США № 6693187, 9181551, в публикации патента США № 2016/0122761 и у Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19, 937-954, 2012, при этом все они включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут присутствовать в смысловой нити, антисмысловой нити или в обеих нитях конструкции для RNAi. К примеру, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В дополнительных вариантах осуществления обе нити содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Конструкции для RNAi могут содержать одну или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей на 3'-конце, 5'-конце, или как на 3'-, так и на 5'-концах смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. Например, в определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит от приблизительно 1 до приблизительно 6 или больше (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) последовательных фосфоротиоатных межнуклеотидных связей на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит от приблизительно 1 до приблизительно 6 или больше (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) последовательных фосфоротиоатных межнуклеотидных связей на 5'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце смысловой нити и одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце антисмысловой нити (т.е. фосфоротиоатную межнуклеотидную связь в случае первой и второй межнуклеотидных связей на 3'-конце антисмысловой нити). В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити. В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити и две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце смысловой нити. В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити и две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-концах смысловой нити (т.е. фосфоротиоатную межнуклеотидную связь в первой и второй межнуклеотидных связях как на 5'-, так и на 3'-концах антисмысловой нити и фосфоротиоатную межнуклеотидную связь в первой и второй межнуклеотидных связях как на 5'-, так и на 3'-концах смысловой нити). В любом из вариантов осуществления, в котором одна или обе нити содержат одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, остальные межнуклеотидные связи внутри цепей могут представлять собой природные сложные 3'-5'-фосфодиэфирные связи. Например, в некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеотидная связь смысловой и антисмысловой нитей выбрана из сложного фосфодиэфира и фосфоротиоата, где по меньшей мере одна межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоат.

В ряде вариантов осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец, два или более неспаренных нуклеотида в составе липкого конца могут быть соединены по-

средством фосфоротиоатной межнуклеотидной связи. В определенных вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном липком конце на 3'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. В других вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном липком конце на 5'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. В еще одних дополнительных вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в любом нуклеотидном липком конце соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями.

В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды, встроенные в одну или обе нити конструкции для RNAi по настоящему изобретению, имеют модификацию нуклеинового основания (также называемого в данном документе как "основание"). Термин "модифицированное нуклеиновое основание" или "модифицированное основание" относится к основанию, отличному от встречающихся в природе пуриновых оснований аденина (A) и гуанина (G) и пиримидиновых оснований тимина (T), цитозина (C) и урацила (U). Модифицированные нуклеиновые основания могут быть синтетическими или встречающимися в природе модификациями и включают без ограничения универсальные основания, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин (X), гипоксантин (I), 2-аминоаденин, 6-метиладенин, 6-метилгуанин и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галогено, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин, 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

В некоторых вариантах осуществления модифицированное основание представляет собой универсальное основание. Термин "универсальное основание" относится к аналогу основания, который неизбирательно образует пары оснований со всеми природными основаниями в РНК и ДНК без изменения двойной спиральной структуры образовавшегося дуплексного участка. Универсальные основы известны специалистам в данной области и включают без ограничения инозин, С-фенил, С-нафтил и другие ароматические производные, азольные карбоксамиды и производные нитроазола, такие как 3-нитропиррол, 4-нитроиндол, 5-нитроиндол и 6-нитроиндол.

Другие подходящие модифицированные основания, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, включают те, которые описаны в публикациях Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, Vol. 10, 297-310, 2000 и Peacock et al., *J. Org. Chem.*, Vol. 76, 7295-7300, 2011, при этом все они включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил могут быть заменены другими нуклеиновыми основаниями, такими как модифицированные нуклеиновые основания, описанные выше, без существенного изменения свойств спаривания оснований у полинуклеотида, содержащего нуклеотид с таким замещенным нуклеиновым основанием.

В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению 5'-конец смысловой нити, антисмысловой нити или как антисмысловой, так и смысловой нити содержит фосфатный фрагмент. Используемый в данном документе термин "фосфатный фрагмент" относится к концевой фосфатной группе, которая включает немодифицированные фосфаты (-O-P=O)(OH)OH), а также модифицированные фосфаты. Модифицированные фосфаты включают фосфаты, в которых одна или несколько групп O и OH заменены на H, O, S, N (R) или алкил, где R представляет собой H, защитную аминогруппу или незамещенный или замещенный алкил. Иллюстративные фосфатные фрагменты включают без ограничения 5'-монофосфат; 5'-дифосфат; 5'-трифосфат; 5'-гуанозиновый кэп (7-метилированный или неметилированный); 5'-аденозиновый кэп или любую другую модифицированную или немодифицированную структуру нуклеотидного кэпа; 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат); 5'-альфа-тиотрифосфат; 5'-гамма-тиотрифосфат, 5'-фосфорамидаты; 5'-винилфосфаты; 5'-алкилфосфонаты (например, алкил = метил, этил, изопропил, пропил и т.д.) и 5'-алкилэфирфосфонаты (например, алкилэфир = метоксиметил, этоксиметил и т.д.).

Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, могут иметь более одной химической модификации из описанных в данном документе. Например, модифицированный нуклеотид может иметь модификацию рибозного сахара, а также модификацию нуклеинового основания. В качестве примера модифицированный нуклеотид может содержать 2'-модификацию сахара (например, 2'-фтор и 2'-метил) и содержать модифицированное основание (например, 5-метилцитозин или псевдоурацил). В других вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара в сочетании с модификацией 5'-фосфата, при этом когда модифицированный нуклеотид будет включен в полинуклеотид, образуется модифицированная межнуклеотидная или межнуклеозидная связь. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара, такую как 2'-фтор-модификация, 2'-О-метил-модификация или бициклическая модификация сахара, а также 5'-фосфоротиоатную группу. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления одна или обе нити конструкции для RNAi по

настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-модифицированных нуклеотидов или BNA и фосфориоатных межнуклеотидных связей. В определенных вариантах осуществления как смысловые, так и антисмысловые нити конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-фтормодифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов и фосфориоатных межнуклеотидных связей. Иллюстративные конструкции для RNAi, содержащие модифицированные нуклеотиды и межнуклеотидные связи, показаны в таблице 2.

Функция конструкции для RNAi.

Предпочтительно конструкции для RNAi по настоящему изобретению снижают или подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках, в частности в клетках печени. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ снижения экспрессии PNPLA3 в клетке путем приведения клетки в контакт с любой конструкцией для RNAi, описанной в данном документе. Клетка может находиться в условиях *in vitro* или *in vivo*. Экспрессию PNPLA3 можно оценивать путем измерения количества или уровня мРНК PNPLA3, белка PNPLA3 или другого биомаркера, связанного с экспрессией PNPLA3. Снижение экспрессии PNPLA3 в клетках или у животных, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, можно определить по сравнению с экспрессией PNPLA3 в клетках или у животных, не обработанных конструкцией для RNAi, либо обработанных контрольной конструкцией для RNAi. Например, в некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии PNPLA3 оценивают путем (а) измерения количества или уровня мРНК PNPLA3 в клетках печени, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению; (б) измерения количества или уровня мРНК PNPLA3 в клетках печени, обработанных контрольной конструкцией для RNAi (например, средством для RNAi, направленным на молекулу РНК, не экспрессируемую в клетках печени, или конструкцией для RNAi, имеющей нонсенс- или скремблированную последовательность) или обработанных без конструкции; и (с) сравнения измеренных уровней мРНК PNPLA3 в обработанных клетках из (а) с измеренными уровнями мРНК PNPLA3 в контрольных клетках из (б). Уровни мРНК PNPLA3 в обработанных клетках и в контрольных клетках перед сравнением могут быть нормализованы относительно уровней РНК контрольного гена (например, 18S рибосомальной РНК). Уровни мРНК PNPLA3 можно измерять с помощью различных методик, включая нозерн-блоттинг, анализ с защитой от действия нуклеаз, гибридизацию *in situ* (FISH), ПЦР с обратной транскрипцией ((RT)-PCR), ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR), количественную ПЦР и им подобные.

В других вариантах осуществления снижение экспрессии PNPLA3 оценивают путем (а) измерения количества или уровня белка PNPLA3 в клетках печени, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению; (б) измерения количества или уровня белка PNPLA3 в клетках печени, обработанных контрольной конструкцией для RNAi (например, средством для RNAi, направленным на молекулу РНК, не экспрессируемую в клетках печени, или конструкцией для RNAi, имеющей нонсенс- или скремблированную последовательность) или обработанных без конструкции; и (с) сравнения измеренных уровней белка PNPLA3 в обработанных клетках из (а) с измеренными уровнями белка PNPLA3 в контрольных клетках из (б). Методики измерения уровней белка PNPLA3 известны специалистам в данной области и включают вестерн-блоттинг, иммуноанализы (например, ELISA) и проточную цитометрию. Иллюстративная методика оценки экспрессии белка PNPLA3 на основе иммуноанализа описана в примере 2. В примере 3 описана иллюстративная методика измерения мРНК PNPLA3 с помощью RNA FISH. Для оценки эффективности конструкции для RNAi по настоящему изобретению может быть использована любая методика, способная измерять мРНК или белок PNPLA3.

В некоторых вариантах осуществления методики оценки уровней экспрессии PNPLA3 выполняют *in vitro* в клетках, которые нативно экспрессируют PNPLA3 (например, в клетках печени) или в клетках, которые были сконструированы для экспрессии PNPLA3. В определенных вариантах осуществления методики проводят *in vitro* в клетках печени. Подходящие клетки печени включают без ограничения первичные гепатоциты (например, гепатоциты человека, нечеловекообразных приматов или грызунов), клетки HepAD38, клетки HuH-6, клетки HuH-7, клетки HuH-5-2, клетки BNLCL2, клетки Hep3B или клетки HepG2. В одном варианте осуществления клетки печени представляют собой клетки Hep3B. В другом варианте осуществления клетки печени представляют собой клетки HepG2.

В других вариантах осуществления методики оценки уровней экспрессии PNPLA3 проводят *in vivo*. Можно вводить конструкции для RNAi и любые контрольные конструкции для RNAi животному (например, грызуну или нечеловекообразному примату) и оценивать уровни мРНК или белка PNPLA3 в образце ткани печени, отобранном у животного после обработки. В качестве альтернативы или дополнительно биомаркер или функциональный фенотип, ассоциированный с экспрессией PNPLA3, можно оценивать у животных, которых обрабатывали указанным средством.

В определенных вариантах осуществления экспрессия PNPLA3 снижена в клетках печени 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 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50% за счет воздействия конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессия PNPLA3 снижена в клетках печени по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на

80% или по меньшей мере на 85% за счет воздействия конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления экспрессия PNPLA3 снижена в клетках печени приблизительно на 90% или больше, например на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше за счет воздействия конструкции для RNAi по настоящему изобретению. Процент снижения экспрессии PNPLA3 можно измерять при помощи любых способов, описанных в данном документе, а также других способов, известных в данной области. К примеру, в определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 45% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках Hep3B (содержащих PNPLA3 дикого типа) *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках Hep3B *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96% или по меньшей мере на 98% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках Hep3B *in vitro*. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 45% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках HepG2 (содержащих два минорных аллеля PNPLA3-rs738409-rs738408) *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках HepG2 *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96% или по меньшей мере на 98% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках HepG2 *in vitro*. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 45% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96% или по меньшей мере на 98% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека *in vitro*. Снижение PNPLA3 можно измерять с использованием различных методов, в том числе RNA FISH или капельной цифровой ПЦР, как это описано в примерах 2 и 3.

В некоторых вариантах осуществления значение IC_{50} рассчитывается для оценки способности конструкции для RNAi по настоящему изобретению подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени. Термин "значение IC_{50} " означает дозу/концентрацию, необходимую для достижения 50% подавления биологической или биохимической функции. Значение IC_{50} для любого конкретного вещества или антагониста можно определить путем построения кривой зависимости "доза-ответ" и изучения влияния различных концентраций вещества или антагониста на уровни экспрессии или функциональную активность, определяемые в любом анализе. Значения IC_{50} можно рассчитать для данного антагониста или вещества путем определения концентрации, необходимой для подавления половины максимального биологического ответа или половины уровней нативной экспрессии. Таким образом, значение IC_{50} для любой конструкции для RNAi может быть рассчитано путем определения концентрации конструкции для RNAi, необходимой, чтобы подавить половину уровня нативной экспрессии PNPLA3 в клетках печени (например, уровня экспрессии PNPLA3 в контрольных клетках печени) в любом анализе, таком как иммуноанализ, или анализ RNA FISH, или анализ с помощью капельной цифровой ПЦР, которые описаны в примерах. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в клетках Hep3B) со значением IC_{50} , составляющим менее приблизительно 20 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках печени со значением IC_{50} , составляющим от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 нМ. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, клетках Hep3B) со значением IC_{50} , составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 10 нМ. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в клетках HepG2) со значением IC_{50} , составляющим менее приблизительно 20 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках печени со значением IC_{50} , составляю-

щим от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 нМ. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, клетках HepG2) со значением IC_{50} , составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 10 нМ. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека) со значением IC_{50} , составляющим менее приблизительно 20 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках печени со значением IC_{50} , составляющим от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,001 до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 нМ. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека) со значением IC_{50} , составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 10 нМ.

Конструкции для RNAi по настоящему изобретению можно легко получить с использованием методов, известных в данной области, например, с использованием обычного твердофазного синтеза нуклеиновых кислот. Полинуклеотиды конструкции для RNAi могут быть собраны на подходящем синтезаторе нуклеиновых кислот с использованием стандартных нуклеотидных или нуклеозидных предшественников (например, фосфорамидитов). Автоматизированные синтезаторы нуклеиновых кислот продаются коммерчески несколькими поставщиками, включая синтезаторы ДНК/РНК от Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния), синтезаторы MerMade от BioAutomation (Ирвинг, Техас) и синтезаторы OligoPilot от GE Healthcare Life Sciences (Питтсбург, Пенсильвания).

Для синтеза олигонуклеотидов посредством химии фосфорамидитов может быть использована 2'-силильная защитная группа в сочетании с кислотолabileм диметокситритилом (DMT) в 5'-положении рибонуклеозидов. Известно, что конечные условия снятия защиты не приводят к значительной деградации РНК-продуктов. Все процессы синтеза можно проводить в любом автоматическом или ручном синтезаторе в большом, среднем или малом масштабе. Синтез также можно проводить в многоруночных планшетах, колонках или предметных стеклах.

2'-О-Силильную группу можно удалить посредством воздействия фторид-ионов, которые могут представлять собой любой источник фторид-иона, например, те соли, которые содержат фторид-ион в сочетании с неорганическими противоионами, например фторид цезия и фторид калия, или те соли, которые содержат фторид-ион в паре с органическим противоионом, например тетраалкиламмонийфторидом. В реакции снятия защиты можно использовать краун-эфирный катализатор в комбинации с неорганическим фторидом. Предпочтительным источником фторид-иона являются тетрабутиламмонийфторид или аминогидрофториды (например, объединение водного HF с триэтиламином в дипольном апротонном растворителе, например, диметилформамиде).

Выбор защитных групп для использования на сложных фосфитных триэфирах и сложных фосфотриэфирах может привести к изменению стабильности сложных триэфиров по отношению к фтору. Метильная защита сложного фосфотриэфира или сложного фосфиттриэфира может стабилизировать связь с ионами фтора и улучшить технологический выход процесса.

Поскольку рибонуклеозиды имеют реакционноспособный 2'-гидроксильный заместитель, может быть желательной защита реакционноспособного 2'-положения в РНК защитной группой, которая будет ортогональна 5'-О-диметокситритильной защитной группе, например, устойчивой к обработке кислотой. Силильные защитные группы соответствуют этому критерию и могут быть легко удалены на конечной стадии снятия защиты с фтора, что может привести к минимальной деградации РНК.

В стандартной реакции связывания фосфорамидита можно использовать тетразольные катализаторы. Предпочтительные катализаторы включают, например, тетразол, S-этилтетразол, бензилтиотетразол, нитрофенилтетразол.

Специалисту в данной области понятно, что дополнительные способы синтеза конструкций для RNAi, описанные в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области. Кроме того, различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или для получения требуемых соединений. Другие превращения синтетической химии, защитные группы (например, для гидроксила, амина и т.д., присутствующие на основаниях) и методология защитных групп (защита и снятие защиты), применимые в синтезе конструкции для RNAi, описанные в данном документе, известны из уровня техники и включают, например, такие, как описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994) и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) и их последующих изданиях. Синтез средств для RNAi по индивидуальному заказу также доступен у нескольких коммерческих поставщиков, в том числе от Dharmascon,

Inc. (Лафайет, Колорадо), AxoLabs GmbH (Кульмбах, Германия) и Ambion, Inc. (Фостер Сити, Калифорния).

Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать лиганд. Используемый в данном документе термин "лиганд" относится к любому соединению или любой молекуле, которые прямо или косвенно способны взаимодействовать с другим соединением или молекулой. Взаимодействие лиганда с другим соединением или молекулой может вызывать биологический ответ (например, инициировать каскад передачи сигнала, индуцировать рецептор-опосредованный эндоцитоз) или может просто представлять собой физическую связь. Лиганд может модифицировать одно или несколько свойств молекулы двухнитевой РНК, к которой он присоединен, таких как фармакодинамические, фармакокинетические, связывающие, абсорбционные свойства, распределение в клетках, поглощение клеткой, заряд и/или клиренс молекулы РНК.

Лиганд может включать белок сыворотки крови (например, человеческий сывороточный альбумин, липопротеин низкой плотности, глобулин), фрагмент холестерина, витамин (биотин, витамин E, витамин B12), фолатный фрагмент, стероид, желчную кислоту (например, холевую кислоту), жирную кислоту (например, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту), углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту), гликозид, фосфолипид или антитело или его связывающий фрагмент (например, антитело или связывающий фрагмент, который нацеливает конструкцию для RNAi на конкретный тип клеток, такой как клетки печени). Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), перекрестносшивающие средства (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафин, сапфин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, адамантануксусную кислоту, 1-пиренбутировую кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, 03-(олеоил)лихолевую кислоту, 03-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин), пептиды (например, пептид antennapedia), пептид Tat, пептиды RGD), алкилирующие средства, полимеры, такие как полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG-40K), полиаминокислоты и полиамины (например, спермин, спермидин).

В определенных вариантах осуществления лиганды обладают эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту конструкции для RNAi по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой поликатионный пептид или пептидомиметик, который проявляет pH-зависимую активность мембраны и фузогенность. В одном варианте осуществления предполагается, что эндосомолитический лиганд имеет функционально активную конформацию при значении pH в эндосоме. Под "активной" конформацией подразумевается конформация, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту конструкции для RNAi по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, Vol. 26, 2964-2972, 1987), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, 1581-1586, 1996) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1559, 56-68, 2002). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая претерпевает изменение заряда или протонирование в ответ на изменение pH. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит липид или другую гидрофобную молекулу. В одном варианте осуществления лиганд содержит фрагмент холестерина или другой стероид. Сообщали, что конъюгированные с холестерином олигонуклеотиды более активны, чем их неконъюгированные аналоги (Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, Vol. 12, 103-228, 2002). Лиганды, содержащие фрагменты холестерина и другие липиды для конъюгации с молекулами нуклеиновых кислот, также были описаны в патентах США № 7851615; 7745608 и 7833992, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В другом варианте осуществления лиганд содержит фолатный фрагмент. Полинуклеотиды, конъюгированные с фолатными фрагментами, могут поглощаться клетками через рецепторно-опосредованный путь эндоцитоза. Такие конъюгаты фолат-полинуклеотид описаны в патенте США № 8188247, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Принимая во внимание, что PNPLA3 экспрессируется в клетках печени (например, в гепатоцитах), в определенных вариантах осуществления желательно специфично доставлять конструкцию для RNAi именно в эти клетки печени. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi могут быть специфично нацелены на печень путем использования лигандов, которые связываются или взаимодействуют с белками, экспрессируемыми на поверхности клеток печени. Например, в определенных вариантах осуществления лиганды могут содержать антигенсвязывающие белки (например, антитела или их связывающие фрагменты (например, Fab, scFv)), которые специфически связываются с рецептором, экспрессируемым на гепатоцитах.

В определенных вариантах осуществления лиганд содержит углевод. Термин "углевод" относится к соединению, состоящему из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Углеводы включают без ограничения сахара (например, моносахариды, дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных единиц) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. В некоторых вариантах осуществления углевод, включенный в лиганд, представляет собой моносахарид, выбранный из пентозы, гексозы или гептозы, и ди- и трисахариды, включающие такие моносахаридные звенья. В других вариантах осуществления углевод, встроенный в лиганд, представляет собой аминсахар, такой как галактозамин, глюкозамин, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит гексозу или гексозамин. Гексоза может быть выбрана из глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы или фруктозы. Гексозамин может быть выбран из фруктозамина, галактозамина, глюкозамина или маннозамина. В определенных вариантах осуществления лиганд содержит глюкозу, галактозу, галактозамин или глюкозамин. В одном варианте осуществления лиганд содержит глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин. В другом варианте осуществления лиганд содержит галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин. В конкретных вариантах осуществления лиганд содержит N-ацетилгалактозамин. Лиганды, содержащие глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин (GalNAc), особенно эффективны в нацеливании соединений на клетки печени. Смотрите, например, D'Souza and Devarajan, J. Control Release, Vol. 203, 126-139, 2015. Примеры GalNAc-или галактозосодержащих лигандов, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патентах США № 7491805; 8106022 и 8877917; в публикации патента США № 2003/0130186 и публикации WIPO № WO 2013/166155, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В определенных вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный углеводный фрагмент. Используемый в данном документе термин "мультивалентный углеводный фрагмент" относится к фрагменту, содержащему два или более углеводных звеньев, способных независимо связываться или взаимодействовать с другими молекулами. Например, мультивалентный углеводный фрагмент содержит два или более связывающих домена, состоящих из углеводов, которые могут связываться с двумя или более различными молекулами или двумя или более различными участками на одной и той же молекуле. Валентность углеводного фрагмента обозначает количество отдельных связывающих доменов в углеводном фрагменте. К примеру, термины "одновалентный", "двухвалентный", "трехвалентный" и "четыревалентный", относящиеся к углеводному фрагменту, относятся к углеводным фрагментам с одним, двумя, тремя и четырьмя связывающими доменами соответственно. Мультивалентный углеводный фрагмент может содержать мультивалентный лактозный фрагмент, мультивалентный галактозный фрагмент, мультивалентный глюкозный фрагмент, мультивалентный N-ацетилгалактозаминоновый фрагмент, мультивалентный N-ацетилглюкозаминоновый фрагмент, мультивалентный маннозный фрагмент или мультивалентный фукозный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный галактозный фрагмент. В других вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный N-ацетилгалактозаминоновый фрагмент. В этих и других вариантах осуществления мультивалентный углеводный фрагмент является двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным. В таких вариантах осуществления мультивалентный углеводный фрагмент может быть двухантенным или трехантенным. В одном конкретном варианте осуществления мультивалентный N-ацетилгалактозаминоновый фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. В другом конкретном варианте осуществления мультивалентный галактозный фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. Иллюстративные трехвалентные и четырехвалентные GalNAc-содержащие лиганды для встраивания в конструкции для RNAi по настоящему изобретению подробно описаны ниже.

Лиганд может быть присоединен или конъюгирован с молекулой РНК конструкции для RNAi непосредственно или опосредованно. К примеру, в некоторых вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен непосредственно к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен через линкер к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi. Лиганд может быть присоединен к нуклеиновым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеотидным связям полинуклеотидов (например, смысловой нити или антисмысловой нити) конструкции для RNAi по настоящему изобретению. Конъюгирование или присоединение к пуриновым нуклеиновым основаниям или их производным может происходить в любом положении, включая эндоциклические и экзоциклические атомы. В определенных вариантах осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеинового основания присоединены к лиганду. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными или присоединение к ним также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть присоединены к лиганду. Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеотидов или присоединение к ним может происходить при любом атоме углерода. Иллюстративные атомы углерода сахарного фрагмента, которые могут быть присоединены к лиганду, включают

атомы углерода в положениях 2', 3'- и 5'. Атом в положении 1' также может быть присоединен к лиганду, такому как остаток основания. Межнуклеотидные связи также могут поддерживать прикрепление лиганда. В случае фосфорсодержащих связей (например, сложной фосфодифирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, фосфоамидатной и т.п.) лиганд может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае аминокислотсодержащих или амидсодержащих межнуклеозидных связей (например, PNA) лиганд может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

В определенных вариантах осуществления лиганд может быть присоединен к 3'- или 5'-концу смысловой или антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к 5'-концу смысловой нити. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к 3'-концу смысловой нити. Например, в некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к 3'-концевому нуклеотиду смысловой нити. В некоторых таких вариантах осуществления лиганд присоединен в 3'-положении 3'-концевого нуклеотида смысловой нити. В альтернативных вариантах осуществления лиганд присоединен вблизи 3'-конца смысловой нити, но перед одним или несколькими концевыми нуклеотидами (например, перед 1, 2, 3 или 4 концевыми нуклеотидами). В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен в 2'-положении сахара, входящего в состав 3'-концевого нуклеотида смысловой нити.

В определенных вариантах осуществления лиганд присоединен к смысловой или антисмысловой нити посредством линкера. Термин "линкер" означает атом или группу атомов, которые ковалентно соединяют лиганд с полинуклеотидным компонентом конструкции для RNAi. Длина линкера может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 30 атомов, от приблизительно 2 до приблизительно 28 атомов, от приблизительно 3 до приблизительно 26 атомов, от приблизительно 4 до приблизительно 24 атомов, от приблизительно 6 до приблизительно 20 атомов, от приблизительно 7 до приблизительно 20 атомов, от приблизительно 8 до приблизительно 20 атомов, от приблизительно 8 до приблизительно 18 атомов, от приблизительно 10 до приблизительно 18 атомов и от приблизительно 12 до приблизительно 18 атомов. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать бифункциональный связывающий фрагмент, который обычно содержит алкильный фрагмент с двумя функциональными группами. Одну из функциональных групп выбирают для связывания с представляющим интерес соединением (например, смысловой или антисмысловой нитью конструкции для RNAi), а другую выбирают для связывания по сути с любой выбранной группой, такой как лиганд, как это описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления линкер содержит структуру цепи или олигомер, которые состоят из повторяющихся звеньев, таких как этиленгликоль или аминокислотные звенья. Примеры функциональных групп, которые обычно используются в бифункциональном связывающем фрагменте, включают без ограничения электрофилы для реакции с нуклеофильными группами и нуклеофилы для реакции с электрофильными группами. В некоторых вариантах осуществления бифункциональные связывающие фрагменты включают амина, гидроксил, карбоновую кислоту, тиол, ненасыщенные группы (например, двойные или тройные связи) и им подобные.

Линкеры, которые можно использовать для присоединения лиганда к смысловой или антисмысловой нити в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, включают без ограничения пирролидин, 8-амино-3,6-ди-оксаоктановую кислоту, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, 6-аминогексановую кислоту, замещенный C₁-C₁₀-алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₀-алкенил или замещенный или незамещенный C₂-C₁₀-алкинил. Предпочтительные группы заместителей для таких линкеров включают без ограничения гидроксил, амина, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тиаалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

В определенных вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. Расщепляемый линкер представляет собой линкер, который достаточно стабилен вне клетки, но который при поступлении в целевую клетку расщепляется, высвобождая две части, которые линкер удерживает вместе. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер расщепляется по меньшей мере в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или по меньшей мере в 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом контрольном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления внутриклеточных состояний), чем в крови субъекта, или при втором контрольном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления условий, наблюдаемых в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые линкеры чувствительны к факторам расщепления, например к значению pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию деструктивных молекул. Как правило, расщепляющие средства более распространены или обнаруживаются при более высоких уровнях или активности внутри клеток, чем в сыворотке крови или в цельной крови. Примеры таких деструктивных средств включают: окислительно-восстановительные средства, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительный расщепляемый линкер путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые

приводят к рН пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемый кислотой линкер, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть специфическими для субстрата) и фосфатазы.

Расщепляемый линкер может содержать фрагмент, который чувствителен к рН. Значение рН сыворотки крови составляет 7,4, в то время как среднее внутриклеточное рН немного ниже, находясь в пределах, составляющих приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислое значение рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы имеют еще более кислое значение рН, составляющее приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, высвобождая таким образом молекулу РНК от лиганда внутри клетки или в требуемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую группу, которая расщепляется определенным ферментом. Тип расщепляемой группы, встроенной в линкер, может зависеть от целевой клетки. Например, нацеливающие на печень лиганды могут быть связаны с молекулами РНК посредством линкера, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, поэтому линкер будет более эффективно расщепляться в клетках печени, чем в других типах клеток, которые не богаты эстеразой. Другие типы клеток, богатых эстеразами, включают клетки легких, коркового вещества почек и яичка. Линкеры, содержащие пептидные связи, могут быть использованы при нацеливании на клетки, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В целом пригодность расщепляемого кандидатного линкера может быть оценена путем тестирования способности деструктивного средства (или состояния) расщеплять кандидатный линкер. Также будет желательно проверить кандидатный расщепляемый линкер на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить и выбрать относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условием, где первое выбрано для указания расщепления в клетке-мишени, а второе выбрано для указания расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке крови. Такое оценивание можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или у целых животных. Может быть полезным провести первоначальное оценивание в условиях бесклеточных систем или условиях культивирования и подтвердить результаты дальнейшим оцениванием у целых животных. В некоторых вариантах осуществления полезные кандидатные линкеры расщепляются по меньшей мере в 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее внутри клетки (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

В других вариантах осуществления используют редокс-расщепляемые линкеры. Редокс-расщепляемые линкеры расщепляются при окислении или восстановлении. Примером восстановительно-расщепляемой группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатный расщепляемый линкер подходящим "восстановительно-расщепляемым линкером" или, например, подходит ли он для использования с определенной конструкцией для RNAi и с определенным лигандом, можно использовать одну или несколько методик, описанных в данном документе. Например, кандидатный линкер можно оценить путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстановителем, известным в данной области, который имитирует скорость расщепления, которая наблюдается в клетке, например в клетке-мишени. Кандидатные линкеры также можно оценивать в условиях, выбранных для имитации условий, протекающих в крови или в сыворотке крови. В конкретном варианте осуществления кандидатные линкеры расщепляются в крови не более чем на 10%. В других вариантах осуществления применимые кандидатные линкеры расщепляются в по меньшей мере 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее внутри клетки (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

В еще одних дополнительных вариантах осуществления расщепляемые линкеры на основе фосфатов расщепляются средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое гидролизует фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как внутриклеточные фосфатазы.

Примерами расщепляемых групп на основе фосфатов являются -O-P(O)(OR_k)-O-, -O-P(S)(OR_k)-O-, -O-P(S)(SR_k)-O-, -S-P(O)(OR_k)-O-, -O-P(O)(OR_k)-S-, -S-P(O)(OR_k)-S-, -O-P(S)(OR_k)-S-, -S-P(S)(OR_k)-O-, -O-P(O)(R_k)-O-, -O-P(S)(R_k)-O-, -S-P(O)(R_k)-O-, -S-P(S)(R_k)-O-, -S-P(O)(R_k)-S-, -O-P(S)(R_k)-S-.

Конкретные варианты осуществления включают -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-.

Другим конкретным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Данные кандидатные линкеры могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

В других вариантах осуществления линкеры могут содержать кислотно-расщепляемые группы, которые представляют собой группы, расщепляемые в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления кислотно-расщепляемые группы расщепляются в кислой среде со значением рН, составляющим приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или средствами, такими как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке специфические органеллы с

низким рН, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить среду для расщепления кислотно-расщепляемых групп. Примеры кислотно-расщепляемых связывающих групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотно-расщепляемые группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. Конкретным вариантом осуществления является случай, когда углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметил, пентил или трет-бутил. Данные кандидатные группы могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

В других вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе сложных эфиров, которые расщепляются ферментами, такими как внутриклеточные эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых сложноэфирных групп включают без ограничения сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые сложным эфиром группы имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Данные кандидатные линкеры могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

В дополнительных вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе пептидов, которые расщепляются такими ферментами, как внутриклеточные пептидазы и протеазы. Расщепляемые группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образовавшиеся между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи между аминокислотами, необходимой для образования пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептидов обычно ограничена пептидной связью (то есть амидной связью) между аминокислотами, образующей пептиды и белки, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$, где RA и RB являются R-группами двух смежных аминокислот. Данные кандидатные группы могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

Другие типы линкеров, подходящие для присоединения лигандов к смысловой или антисмысловой нитям в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, известны из уровня техники и могут включать линкеры, описанные в патентах США № 7723509; 8017762; 8828956; 8877917 и 9181551, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В определенных вариантах осуществления лиганд, ковалентно присоединенный к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi по настоящему изобретению, содержит фрагмент GalNAc, например мультивалентный фрагмент GalNAc. В некоторых вариантах осуществления мультивалентный фрагмент GalNAc представляет собой трехвалентный фрагмент GalNAc, и он присоединен к 3'-концу смысловой нити. В других вариантах осуществления мультивалентный фрагмент GalNAc представляет собой трехвалентный фрагмент GalNAc, и он присоединен к 5'-концу смысловой нити. В еще одних дополнительных вариантах осуществления мультивалентный фрагмент GalNAc представляет собой четырехвалентный фрагмент GalNAc, и он присоединен к 3'-концу смысловой нити. В еще одних дополнительных вариантах осуществления мультивалентный фрагмент GalNAc представляет собой четырехвалентный фрагмент GalNAc, и он присоединен к 5'-концу смысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетку или ткань, представляющие интерес, путем введения вектора, который кодирует и контролирует внутриклеточную экспрессию конструкции для RNAi. Термин "вектор" (также упоминаемый в данном документе как "вектор экспрессии") относится к композиции вещества, которая может быть использована для доставки представляющей интерес нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Из уровня техники известны многочисленные векторы, включая без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, а также плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Примеры вирусных векторов включают без ограничения аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и им подобные. Вектор может реплицироваться в живой клетке или может быть получен синтетическим путем.

В общих чертах вектор для экспрессии конструкции для RNAi по настоящему изобретению будет содержать один или несколько промоторов, функционально связанных с последовательностями, кодирующими конструкцию для RNAi. Используемые в данном документе выражения "функционально связанный" или "под контролем транскрипции" означают, что промотор находится в правильном положении и правильной ориентации относительно полинуклеотидной последовательности, чтобы контролировать инициацию транскрипции РНК-полимеразой и экспрессию полинуклеотидной последовательности. Термин "промотор" относится к последовательности, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или к введенному синтетическому аппарату, необходимому для инициации специфической транскрипции последовательности гена. Подходящие промоторы включают без ограничения RNA pol I, pol II, III или U6 RNA pol III, а также вирусные промоторы (например, промотор немедленно-раннего гена цитомега-

ловируса человека (CMV), ранний промотор SV40 и длинный кольцевой повтор вируса саркомы Рауса). В некоторых вариантах осуществления предпочтительным является промотор H1 или U6RNA pol III. Промотор может быть тканеспецифичным или индуцируемым промотором. Особый интерес представляют специфичные для печени промоторы, такие как промоторные последовательности гена альфа-1-антитрипсина человека, гена альбумина, гена гемопексина и гена липазы печени. Индуцируемые промоторы включают промоторы, регулируемые экдизоном, эстрогеном, прогестероном, тетрациклином и изопротил-PD1-тиогалактопиранозидом (IPTG).

В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит siRNA, две отдельные нити (смысловая и антисмысловая нити) могут экспрессироваться с одного вектора или из двух отдельных векторов. Например, в одном варианте осуществления последовательность, кодирующая смысловую нить, функционально связана с промотором на первом векторе, а последовательность, кодирующая антисмысловую нить, функционально связана с промотором на втором векторе. В таком варианте осуществления первый и второй векторы вводят совместно, например путем инфекции или трансфекции, в клетку-мишень, так что смысловая и антисмысловая нити после прохождения транскрипции будут гибридизоваться внутри клетки с образованием молекулы siRNA. В другом варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити транскрибируются с двух разных промоторов, расположенных в одном векторе. В некоторых таких вариантах осуществления последовательность, кодирующая смысловую нить, функционально связана с первым промотором, а последовательность, кодирующая антисмысловую нить, функционально связана со вторым промотором, при этом первый и второй промоторы расположены в одном векторе. В одном варианте осуществления вектор содержит первый промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей молекулу siRNA, и второй промотор, функционально связанный с той же последовательностью в противоположном направлении, так что транскрипция последовательности из первого промотора приводит к синтезу смысловой нити молекулы siRNA, а транскрипция последовательности из второго промотора приводит к синтезу антисмысловой нити молекулы siRNA.

В других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит shRNA, последовательность, кодирующая одну по меньшей мере частично самокомплементарную молекулу РНК, функционально связана с промотором, что приводит к продуцированию одного транскрипта. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая shRNA, содержит инвертированный повтор, связанный линкерной полинуклеотидной последовательностью, что приводит к продуцированию структуры стебля и петли shRNA после транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий конструкцию для RNAi по настоящему изобретению, представляет собой вирусный вектор. Разные вирусные векторные системы, подходящие для экспрессии конструкций для RNAi, описанных в данном документе, включают без ограничения аденовирусные векторы, ретровирусные векторы (например, лентивирусные векторы, вирус мышьяного лейкоза Малони), аденоассоциированные вирусные векторы; векторы на основе вируса простого герпеса; векторы на основе SV40; векторы на основе вируса полиомы; векторы на основе вируса папилломы; векторы на основе пикорнавируса и векторы на основе вируса оспы (например, вируса коровьей оспы). В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор).

Разные векторы, подходящие для использования в настоящем изобретении, способы вставки последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих молекулы siRNA или shRNA, в векторы, и способы доставки векторов к интересующим клеткам известны специалистам в данной области. См., например, Dornburg, *Gene Therap.*, Vol. 2, 301-310, 1995; Eglitis, *Biotechniques*, Vol. 6, 608-614, 1988; Miller, *Hum-Gene Therap.*, Vol. 1, 5-14, 1990; Anderson, *Nature*, Vol. 392, 25-30, 1998; Rubinson D.A. et al., *Nat. Genet.*, Vol. 33, 401-406, 2003; Brummelkamp et al., *Science*, Vol. 296, 550-553, 2002; Brummelkamp et al., *Cancer Cell*, Vol. 2, 243-247, 2002; Lee et al., *Nat. Biotechnol.*, Vol. 20, 500-505, 2002; Miyagishi et al., *Nat. Biotechnol.*, Vol. 20, 497-500, 2002; Paddison et al., *GenesDev*, Vol. 16, 948-958, 2002; Paul et al., *Nat. Biotechnol.*, Vol. 20, 505-508, 2002; Sui et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 99, 5515-5520, 2002 и Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 99, 6047-6052, 2002, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В настоящее изобретение также включены фармацевтические композиции и составы, содержащие описанные в данном документе конструкции для RNAi и фармацевтически приемлемые носители, наполнители или разбавители. Такие композиции и составы применимы в снижении экспрессии PNPLA3 у нуждающегося в этом субъекта. Когда предполагается применение в клинической практике, фармацевтические композиции и составы будут производиться в форме, подходящей для предполагаемого применения. В целом это предусматривает получение композиций, которые по сути не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для людей или животных.

Фразы "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель" включает растворители,

буферы, растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и им подобные, приемлемые для использования в составлении фармацевтических препаратов, как, например, фармацевтических препаратов, подходящих для введения людям. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство несовместимы с конструкциями для RNAi по настоящему изобретению, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции при условии, что они не инактивируют векторы или конструкции для RNAi в данных композициях.

Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, включая без ограничения способ введения, тип и степень заболевания или нарушения, подлежащего лечению, или дозу, подлежащую введению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены на основе предполагаемого способа доставки. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены для парентеральной доставки. Парентеральные формы доставки включают внутривенную, внутриаартериальную, подкожную, интраокальную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенной доставки. В таком варианте осуществления фармацевтическая композиция может включать средство для доставки на основе липидов. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для подкожной доставки. В таком варианте осуществления фармацевтическая композиция может включать нацеливающий лиганд (например, описанные в данном документе лиганды, содержащие GalNAc).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество описанной в данном документе конструкции для RNAi. Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для получения полезного или желаемого клинического результата. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество означает количество, достаточное для снижения экспрессии PNPLA3 в гепатоцитах субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество может быть количеством, достаточным только для частичного снижения экспрессии PNPLA3, например, до уровня, сопоставимого с экспрессией аллеля PNPLA3 дикого типа в гетерозиготах человека. Сообщалось, что у людей, гетерозиготных по аллельным вариантам PNPLA3 с потерей функции, наблюдались более низкие уровни холестерина non-HDL в сыворотке крови и более низкий риск возникновения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда по сравнению с индивидуумами без соответствующих аллельных вариантов (Nioi et al., *New England Journal of Medicine*, Vol. 374(22):2131-2141, 2016). Таким образом, не ограничиваясь теорией, считается, что частичное снижение экспрессии PNPLA3 может быть достаточным для достижения полезного снижения уровней сывороточного холестерина non-HDL в сыворотке крови и снижения риска возникновения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.

Эффективное количество конструкции для RNAi по настоящему изобретению может составлять от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,05 до приблизительно 75 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг веса тела, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг веса тела или от приблизительно 5 до приблизительно 15 мг/кг веса тела. В определенных вариантах осуществления однократная эффективная доза конструкции для RNAi по настоящему изобретению может составлять приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг. Фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество конструкции для RNAi, можно вводить еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или раз в два года. Точное определение того, что считается эффективным количеством и частотой введения, может основываться на нескольких факторах, включая вес пациента, его возраст и общее состояние, тип подлежащего лечению нарушения (например, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, гиперхолестеринемия), конкретную используемую конструкцию для RNAi и способ ее введения. Оценки эффективных дозировок и периодов полужизни *in vivo* для любой конкретной конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть установлены с использованием обычных методик и/или испытаний на соответствующих моделях животных.

Введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно осуществлять любым традиционным способом, если целевая ткань доступна при этом способе введения. Такие способы введения включают без ограничения парентеральный (например, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный или внутривенный), оральный, назальный, буккальный, внутрикожный, трансдермальный и сублингвальный способы или путем прямой инъекции в ткань печени или доставки через печеночную портальную вену. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально. К примеру, в определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно.

Коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы, могут использоваться в качестве средств доставки конструкций для RNAi по настоящему изобретению или векторов, кодирующих такие конструкции. Коммерчески доступные жировые эмульсии, которые подходят для доставки нуклеиновых кислот по изобретению, включают Intralipid®, Liposyn®, Liposyn®II, Liposyn®III, Nutrilipid и другие подобные липидные эмульсии. Предпочтительной коллоидной системой, предназначенной для использования в качестве средства для доставки *in vivo*, является липосома (т.е. везикула с искусственной мембраной). Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности с катионными липосомами. В качестве альтернативы конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтанолламин) (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC)), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеилфосфатидилэтанолламин (DOTMA)) липиды и липосомы. Получение и использование таких коллоидных дисперсионных систем хорошо известны из уровня техники. Иллюстративные составы также раскрыты в патентах США № 5981505; 6217900; 6383512; 5783565; 7202227; 6379965; 6127170; 5837533; 6747014 и в публикации заявки по РСТ № WO 03/093449.

В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению полностью инкапсулированы в липидный состав, например, для образования SPLP, pSPLP, SNALP или других частиц типа "нуклеиновая кислота-липид". Используемый в данном документе термин "SNALP" относится к стабильной частице типа "нуклеиновая кислота-липид", включая SPLP. Используемый в данном документе термин "SPLP" относится к частице типа "нуклеиновая кислота-липид", которая содержит плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу. SNALP и SPLP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). SNALP и SPLP исключительно полезны для системных применений, поскольку после внутривенного введения они демонстрируют увеличенное время циркуляции в кровотоке и накапливаются в удаленных участках (например, физически отделенных от участка введения). SPLP включают "pSPLP", которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующего средства и нуклеиновой кислоты, как изложено в публикации по РСТ № WO 00/03683. Частицы типа "нуклеиновая кислота-липид" обычно имеют средний диаметр, составляющий от приблизительно 50 до приблизительно 150 нМ, от приблизительно 60 до приблизительно 130 нМ, от приблизительно 70 до приблизительно 110 нМ или от приблизительно 70 до приблизительно 90 нМ, и по сути они не токсичны. Кроме того, когда нуклеиновые кислоты присутствуют в частицах типа "нуклеиновая кислота-липид", в водном растворе они являются устойчивыми к деградации нуклеазой. Частицы типа "нуклеиновая кислота-липид" и способ их получения раскрыты, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432 и публикации заявки по РСТ № WO 96/40964.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают, например, стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Как правило, данные препараты являются стерильными и жидкими до такой степени, что они способны легко проходить через иглу при введении. Препараты должны быть стабильными в условиях изготовления и хранения и должны быть защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Подходящие растворители или дисперсионные носители могут содержать, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть вызвано различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тиомерсалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута за счет использования в композициях средств замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем добавления по мере необходимости активных соединений в соответствующем количестве в растворитель вместе с любыми другими ингредиентами (например, перечисленными выше) с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из, например, перечисленных выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы получения включают мето-

дики вакуумной сушки и лиофильной сушки, которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента (ингредиентов) плюс любого дополнительного необходимого ингредиента из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Композиции по настоящему изобретению, как правило, могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают, например, соли присоединения кислот (образованные со свободными аминогруппами), полученные из неорганических кислот (например, соляной или фосфорной кислот) или полученные из органических кислот (например, уксусной, шавелевой, винной, миндальной и т.п.). Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований (например, гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция или железа) или из органических оснований (например, изопропиламина, триметиламина, гистидина, прокаина и т.п.).

Например, для парентерального введения в водном растворе раствор, к примеру, в достаточной степени забуферен, а жидкий разбавитель сначала делают изотоническим, например, путем использования достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие водные растворы можно использовать, например, для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Предпочтительно используют стерильные водные среды, известные специалистам в данной области, особенно в свете раскрытия настоящего изобретения. В качестве иллюстрации одну дозу можно растворять в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлять к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо вводить в предлагаемый участок для инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, p. 1035-1038 и 1570-1580). Для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требуют стандарты FDA. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит или состоит из стерильного физиологического раствора и описанной в данном документе конструкции для RNAi. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит или состоит из описанной в данном документе конструкции для RNAi и стерильной воды (например, воды для инъекции, WFI). В дополнительных других вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит или состоит из описанной в данном документе конструкции для RNAi и фосфатно-буферного солевого раствора (PBS).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению упакованы или хранятся в устройстве для введения. Устройства для введения инъекционных составов включают без ограничения порт-системы для инъекций, предварительно заполненные шприцы, автоматические инъекторы, инъекционные помпы, нательные инъекторы и шприцы-ручки. Устройства для введения аэрозольных или порошковых составов включают без ограничения ингаляторы, инсуффляторы, аспираторы и т.п. Таким образом, в настоящее изобретение включены устройства для введения, содержащие фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для лечения или профилактики одного или нескольких нарушений, описанных в данном документе.

Способы подавления экспрессии PNPLA3

В настоящем изобретении также представлены способы подавления экспрессии гена PNPLA3 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например двухнитевым средством для RNAi, в количестве, которое является эффективным для подавления экспрессии PNPLA3 внутри клетки, за счет чего подавляется экспрессия PNPLA3 внутри клетки. Приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например с двухнитевым средством для RNAi, можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vivo* включает приведение в контакт клетки или группы клеток внутри субъекта, например субъекта-человека, со средством для RNAi. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*.

В настоящем изобретении представлены способы снижения или подавления экспрессии PNPLA3 у нуждающегося в этом субъекта, а также способы лечения или предотвращения состояний, заболеваний или нарушений, ассоциированных с экспрессией или активностью PNPLA3. Выражение "состояние, заболевание или нарушение, ассоциированное с экспрессией PNPLA3" относится к состояниям, заболеваниям или нарушениям, при которых наблюдаются изменения уровней экспрессии PNPLA3 или при которых повышенные уровни экспрессии PNPLA3 ассоциированы с повышенным риском развития состояния, заболевания или нарушения.

Приведение в контакт с клеткой может быть прямым или опосредованным, как обсуждалось выше. Кроме того, приведение в контакт с клеткой может быть осуществлено посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного из уровня техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд GalNAc3 или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к представляющему интерес участку.

В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с RNAi включает "введение" или "доставку средства для RNAi в клетку" путем облегчения или осуществления захвата клеткой или путем абсорбции внутрь клетки. Абсорбция или захват средства для RNAi может происходить в результате неконтролируемых диффузионных или активных клеточных процессов либо посредством вспомогательных

средств или устройств. Введение средства для RNAi в клетку может быть осуществлено *in vitro* и/или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* RNAi можно вводить в участок ткани или вводить системно. Введение в клетку *in vitro* включает способы, известные в данной области, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в данном документе ниже и/или известны из уровня техники.

Термин "подавление", используемый в данном документе, используется взаимозаменяемо с терминами "снижение", "сайленсинг", "понижающая регуляция", "супрессия" и другими подобными терминами и включает любой уровень подавления.

Фраза "подавление экспрессии PNPLA3" подразумевает подавление экспрессии любого гена PNPLA3 (например, такого, как ген PNPLA3 мыши, ген PNPLA3 крысы, ген PNPLA3 обезьяны или ген PNPLA3 человека), а также вариантов или мутантных вариантов гена PNPLA3. Таким образом, ген PNPLA3 может представлять собой ген дикого типа PNPLA3, мутантный ген PNPLA3 (такой как мутантный ген PNPLA3, вызывающий отложение амилоида) или генетически модифицированный ген PNPLA3 в контексте генетически модифицированных клеток, группы клеток или организма.

Термин "подавление экспрессии гена PNPLA3" включает любой уровень подавления гена PNPLA3, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена PNPLA3. Экспрессия гена PNPLA3 может быть оценена на основе уровня или изменения уровня любого параметра, ассоциированного с экспрессией гена PNPLA3, например, уровня мРНК PNPLA3, белка PNPLA3 или количества или степени амилоидных отложений. Оценку этого уровня можно проводить в отдельной клетке или в группе клеток, включая, например, образец, полученный от субъекта.

Подавление можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одного или нескольких параметров, ассоциированных с экспрессией PNPLA3, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может быть любым типом контрольного уровня, который используется в данной области, например, исходным уровнем до введения дозы или уровнем, определенным для аналогичного субъекта, клетки или образца, который не подвергали обработке или обрабатывали с помощью контрольного раствора (такого как, например, контроль, представляющий собой только буфер, или контроль, представляющий собой неактивное средство). В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена PNPLA3 подавляется по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%.

Подавление экспрессии гена PNPLA3 может проявляться уменьшением количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген PNPLA3 и которая была или которые были обработаны (например, путем приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению или путем введения средства для RNAi по настоящему изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали), так что происходит подавление экспрессии гена PNPLA3 по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по сути идентичной первой клетке или группе клеток, но которую не подвергали или которые не подвергали такой обработке (контрольная клетка (клетки)). В предпочтительных вариантах осуществления подавление экспрессии оценивают, выражая уровень мРНК в обработанных клетках в виде процентного содержания от уровня мРНК в контрольных клетках, используя следующую формулу:

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

В качестве альтернативы подавление экспрессии гена PNPLA3 можно оценивать с точки зрения уменьшения параметра, который функционально связан с экспрессией гена PNPLA3, например экспрессии белка PNPLA3 или активности белка сигнального пути Hedgehog. Сайленсинг гена PNPLA3 может быть определен в любой клетке, экспрессирующей PNPLA3 либо конститутивно, либо в результате генной инженерии и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Подавление экспрессии белка PNPLA3 может проявляться снижением уровня белка PNPLA3, экспрессируемого клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как было объяснено выше, для оценки степени супрессии мРНК подавление уровня экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогичным образом выра-

жено в процентах от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольные клетка или группа клеток, которые могут быть использованы для оценки степени подавления экспрессии гена PNPLA3, включают клетку или группу клеток, которые еще не были приведены в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) до лечения субъекта средством для RNAi.

Уровень мРНК PNPLA3, который экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей в крови мРНК PNPLA3 могут быть определены с использованием любой методики, известной в данной области, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии PNPLA3 в образце определяют путем выявления транскрибированного полинуклеотида или его части, например, мРНК гена PNPLA3. РНК может быть выделена из клеток с использованием методов экстракции РНК, включая, например, экстракцию кислым фенолом/изотиоцианатом гуанидина (RNAzol B; Biogenesis), наборами для выделения РНК RNeasy (Qiagen) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализа, использующие гибридизацию с рибонуклеиновой кислотой, включают кинетические анализы экспрессии генов, ПЦР с обратной транскрипцией, анализы с защитой от действия РНКазы (Melton et al., *Nuc. Acids Res.* 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричный анализ. Циркулирующая в крови мРНК PNPLA3 может быть выявлена с использованием методик, описанных в заявке РСТ/US2012/043584, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии PNPLA3 определяют с помощью зонда на основе нуклеиновой кислоты. Термин "зонд", используемый в данном документе, относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться с конкретным PNPLA3. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально сконструированы для введения метки. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенная мРНК может быть использована в анализах гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения блоттинг по Саузерну и нозерн-блоттинг, анализы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и матрицы зондов. Одна из методик определения уровней мРНК включает приведение в контакт выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК PNPLA3. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизована на твердой поверхности и ее приводят в контакт с зондом, например, путем разгона выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлозную мембрану. В альтернативном варианте осуществления зонд (зонды) иммобилизованы на твердой поверхности и мРНК вступает в контакт с зондом (зондами), например, на ДНК-чипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы выявления мРНК для использования при определении уровня мРНК PNPLA3.

Альтернативный способ определения экспрессии PNPLA3 в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты и/или действия обратной транскриптазой (для получения кДНК), например мРНК в образце, например, при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (экспериментальный вариант осуществления изложен у Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (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 "клящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновых кислот с последующим выявлением амплифицированных молекул с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы выявления особенно полезны для выявления молекул нуклеиновых кислот, когда такие молекулы присутствуют в очень небольших количествах. В конкретных аспектах изобретения уровень экспрессии PNPLA3 определяют с помощью количественной флуорогенной ПЦР с обратной транскрипцией (т.е. системы TaqMan™). Мониторинг уровней экспрессии мРНК PNPLA3 можно проводить с использованием мембранного блоттинга (такого как используемый в гибридизационном анализе, например, нозерн-блоттинг, блоттинг по Саузерну, дот-блоттинг и т.п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровней экспрессии PNPLA3 может также включать использование зондов нуклеиновых кислот в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с использованием анализов разветвленной ДНК (bdNA) или ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Использование этих способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе.

Уровень экспрессии белка PNPLA3 может быть определен с использованием любого способа, известного в данной области, для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электро-

форез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, жидкостные или гелевые реакции преципитации в жидкости или в геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т.п.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению можно контролировать, выявляя или отслеживая уменьшение симптомов заболевания, связанного с PNPLA3, например, уменьшение отечности конечностей, лица, гортани, верхних дыхательных путей, живота, туловища и половых органов, продрома; отека гортани; не зудящей сыпи; тошноты; рвоты или боли в животе. Данные симптомы можно оценивать *in vitro* или *in vivo* с использованием любого способа, известного в данной области.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту таким образом, что средство для RNAi поступает в конкретный участок внутри субъекта. Подавление экспрессии PNPLA3 может быть оценено с использованием измерений уровня или изменений уровня мРНК PNPLA3 или белка PNPLA3 в образце, полученном из жидкости или ткани в определенном участке субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления участок выбран из группы, состоящей из печени, сосудистого сплетения, сетчатки и поджелудочной железы. Участок также может быть частью или подгруппой клеток из любых вышеупомянутых участков. Участок может также включать клетки, которые экспрессируют определенный тип рецептора.

Способы лечения или предотвращения заболеваний, ассоциированных с PNPLA3.

В настоящем изобретении представлены терапевтические и профилактические способы, которые включают введение субъекту с заболеванием, нарушением и/или состоянием, ассоциированным с PNPLA3, или склонному к развитию заболевания, нарушения и/или состояния, ассоциированного с PNPLA3, композиции, содержащей средство для RNAi, или фармацевтических композиций, содержащих средство для RNAi, или векторов, экспрессирующих средство для RNAi по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры заболеваний, ассоциированных с PNPLA3, включают, например, жировой гепатоз (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, накопление жира в печени, воспаление печени, гепатоцеллюлярный некроз, фиброз печени, ожирение или неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD). В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с PNPLA3, представляет собой NAFLD. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с PNPLA3, представляет собой NASH. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с PNPLA3, представляет собой жировой гепатоз (стеатоз). В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с PNPLA3, представляет собой инсулинорезистентность. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с PNPLA3, не представляет собой инсулинорезистентность.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ снижения экспрессии PNPLA3 у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту любой из описанных в данном документе конструкций для RNAi. Термин "пациент", используемый в данном документе, относится к млекопитающему, в том числе к человеку, и может использоваться взаимозаменяемо с термином "субъект". Предпочтительно уровень экспрессии PNPLA3 в гепатоцитах у пациента снижается после введения конструкции для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии PNPLA3 у пациента, не получавшего конструкцию для RNAi.

Способы по настоящему изобретению применимы для лечения субъекта с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, например, субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии гена PNPLA3 и/или продуцирования белка PNPLA3. В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы снижения уровня экспрессии гена, кодирующего белок 3, содержащий пататин-подобный фосфолипазный домен (PNPLA3), у субъекта с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы снижения уровня белка PNPLA3 у субъекта с NAFLD. В настоящем изобретении также представлены способы снижения уровня активности сигнального пути hedgehog у субъекта с NAFLD.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения субъекта с NAFLD. В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения субъекта с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, например с жировым гепатозом (стеатозом), неалкогольным стеатогепатитом (NASH), циррозом печени, накоплением жира в печени, воспалением печени, гепатоцеллюлярным некрозом, фиброзом печени, ожирением или неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). Способы лечения (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, или вектор по настоящему изобретению, экспрессирующий средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3.

В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта с NAFLD, например, наличия повышенной активности сигнальных путей hedgehog, усталости, слабости, потери веса, потери аппетита, тошноты, боли в животе, сосудистых звездочек, пожелтения кожи и глаз (желтуха), зуда, накопления жидкости и отека ног (отека), отека живота (асцит) и спутанности сознания. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например dsRNA, фармацевтических композиций или векторов по настоящему изобретению, за счет чего предотвращается возникновение по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, которое может быть улучшено за счет снижения экспрессии гена PNPLA3.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены варианты применения терапевтически эффективного количества средства для RNAi по настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3. В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены варианты применения средства для RNAi, например dsRNA, по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующей на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, в производстве лекарственного препарата, предназначенного для лечения субъекта, например, субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 и/или продуцирования белка PNPLA3, как, например, субъекта с нарушением, которое может быть улучшено за счет снижения экспрессии гена PNPLA3, например, заболевания, ассоциированного с PNPLA3.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены варианты применения средства для RNAi, например dsRNA, по настоящему изобретению для предотвращения возникновения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, которое может быть улучшено за счет снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 и/или продуцирования белка PNPLA3.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены варианты применения средства для RNAi по настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата, предназначенного для предотвращения возникновения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, которое может быть улучшено за счет снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 и/или продуцирования белка PNPLA3, например, заболеванием, ассоциированным с PNPLA3.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на PNPLA3, вводится субъекту с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, например, неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), вследствие чего экспрессия гена PNPLA3, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости у субъекта снижается по меньшей мере приблизительно на 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере приблизительно 99% или больше, если субъекту вводится средство на основе dsRNA.

Способы и варианты применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, вследствие чего экспрессия целевого гена PNPLA3 снижается, например, в течение приблизительно 1, 2, 3, 4 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или приблизительно 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена PNPLA3 снижается в течение длительного периода, например, в течение по меньшей мере приблизительно двух, трех, четырех, пяти, шести, семи дней или больше, например, в течение приблизительно одной недели, двух недель, трех недель или приблизительно четырех недель или дольше.

Введение dsRNA в соответствии со способами и вариантами применения по настоящему изобретению может привести к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или уровня маркеров заболеваний или нарушений у пациента с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, например неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). Под "снижением" в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100%. Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, соответствующего данному заболеванию, которое лечат или которое пытаются нацеленно предотвратить. Специалист в данной области вполне способен контролировать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения NAFLD можно оценивать, например, путем периодического мониторинга симптомов NAFLD, уровней жира в печени или экспрессии генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов. Сравнение более поздних показаний с первоначальными показаниями предоставляет врачу указание на то, является ли лечение эффективным. Специалист в данной области вполне способен контролировать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением средства для RNAi, целенаправленно воздействующего на PNPLA3, или его фарма-

цветической композиции "эффективность относительно" заболевания, ассоциированного с PNPLA3, указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к положительному эффекту для по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, например, к улучшению симптомов, излечению, снижению тяжести заболевания, продлению жизни, улучшению качества жизни или к другому эффекту, который является общепризнанным положительным среди врачей, знакомых с лечением NAFLD и/или заболевания, ассоциированного с PNPLA3 и связанных с ним причин.

Лечебный или превентивный эффект проявляется тогда, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров статуса заболевания, или когда не происходит ухудшение или развитие симптомов в тех случаях, в которых иначе их можно было бы ожидать. В качестве примера благоприятное изменение по меньшей мере на 10% в измеряемом параметре заболевания, и предпочтительно по меньшей мере на 20, 30, 40, 50% или больше может свидетельствовать об эффективном лечении. Эффективность данного лекарственного средства на основе RNAi или состава с этим лекарственным средством также можно оценивать путем использования экспериментальной модели животного для данного заболевания, известной в данной области. При использовании экспериментальной модели животного эффективность лечения подтверждается, когда наблюдается статистически значимое снижение маркера или симптома.

Субъектам может быть введено терапевтическое количество средства для RNAi, как, например, приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 9,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или приблизительно 50 мг/кг dsRNA. В одном варианте осуществления субъектам можно вводить 0,5 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также рассматриваются как часть данного изобретения.

Введение средства для RNAi может снижать уровни присутствующего белка PNPLA3, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте организма пациента по меньшей мере приблизительно на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере приблизительно на 99% или больше.

Перед введением полной дозы средства для RNAi пациентам можно вводить меньшую дозу, например 5% инфузию, и проводить мониторинг на наличие побочных эффектов, таких как аллергическая реакция. В другом примере можно проводить мониторинг пациента на наличие нежелательных иммуностимулирующих эффектов, таких как повышение уровня цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Из-за ингибирующих эффектов в отношении экспрессии PNPLA3 композиция по настоящему изобретению или полученная из нее фармацевтическая композиция может улучшить качество жизни.

Средство для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме, где модифицированное или немодифицированное средство для RNAi непосредственно суспендировано в водном или подходящем буферном растворителе в виде "свободного средства для RNAi". Свободное средство для RNAi вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Свободное средство для RNAi может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-буферный солевой раствор (PBS). Показатель pH и осмоляльность буферного раствора, содержащего средство для RNAi, можно откорректировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы средство для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальный состав с dsRNA.

Субъектами, которые могут получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3, являются субъекты с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD) и/или заболеванием или нарушением, ассоциированными с PNPLA3, описанными в данном документе.

Лечение субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3, включает терапевтическое и профилактическое лечение.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы и варианты применения средства для RNAi или фармацевтической композиции на его основе для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3, например субъекта с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, в комбинации с другими фармацевтическими средствами и/или другими терапевтическими способами, например с известными фармацевтическими средствами и/или известными терапевтическими способами, такими как, например, те, которые в настоящее время используют для лечения данных нарушений.

Например, в определенных вариантах осуществления средство для RNAi, целенаправленно воздей-

ствующее на ген PNPLA3, вводят в комбинации с, например, средством, которое является применимым в лечении заболевания, ассоциированного с PNPLA3, описанного в другом месте данного документа. Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, подходящие для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии PNPLA3, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, включают средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на другую часть гена PNPLA3, терапевтическое средство и/или процедуры для лечения заболевания, ассоциированного с PNPLA3, или комбинацию любого из вышеизложенного.

В определенных вариантах осуществления первое средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, вводят в комбинации со вторым средством для RNAi, целенаправленно воздействующим на другую часть гена PNPLA3. Например, первое средство для RNAi содержит первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где по сути все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и по сути все нуклеотиды первой антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; а второе средство для RNAi содержит вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где по сути все нуклеотиды второй смысловой нити и по сути все нуклеотиды второй антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды первой и второй смысловых нитей и/или все нуклеотиды первой и второй антисмысловых нитей содержат модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого нуклеотида дезокситимина (dT), 2'-О-метилмодифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, открытого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидросигекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления первое средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, вводят в комбинации со вторым средством для RNAi, целенаправленно воздействующим на ген, отличающийся от гена PNPLA3. Например, средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, можно вводить в комбинации со средством для RNAi, целенаправленно воздействующим на ген SCAP. Первое средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, и второе средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген, отличающийся от гена PNPLA3, например на ген SCAP, могут быть введены как части одной и той же фармацевтической композиции. В качестве альтернативы первое средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, и второе средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген, отличающийся от гена PNPLA3, например на ген SCAP, могут быть введены как части разных фармацевтических композиций.

Средство для RNAi и дополнительное терапевтическое средство и/или препарат можно вводить одновременно и/или в такой же комбинации, например парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции, или в разные моменты времени, и/или другим способом, известным в данной области или описанным в данном документе.

В настоящем изобретении также представлены способы применения средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, для снижения и/или подавления экспрессии PNPLA3 в клетке. В других аспектах настоящего изобретения представлены средство для RNAi по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая средство для RNAi по настоящему изобретению, для применения с целью снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 в клетке. В еще одних аспектах представлено применение средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, или изготовление лекарственного препарата для снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 в клетке. В других аспектах настоящего изобретения представлены средство для RNAi по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая средство для RNAi по настоящему изобретению, для применения в снижении и/или подавлении продуцирования белка PNPLA3 в клетке. В еще одних аспектах представлено применение средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей RNAi по

настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или подавления продуцирования белка PNPLA3 в клетке. Способы и варианты применения включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например dsRNA, по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения деградации транскрипта мРНК гена PNPLA3, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена PNPLA3 или подавление продуцирования белка PNPLA3 в клетке.

Снижение экспрессии гена можно оценить любыми способами, известными в данной области. Например, снижение экспрессии PNPLA3 может быть установлено путем определения уровня экспрессии мРНК PNPLA3 с помощью способов, являющихся обычной практикой для специалиста в данной области, например, с помощью нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка PNPLA3 с помощью способов, являющихся обычной практикой для специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики, методики проточной цитометрии, ELISA и/или путем определения биологической активности PNPLA3.

В способах и вариантах применения по настоящему изобретению клетка может быть приведена в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может быть внутри субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген PNPLA3, например, клетка от субъекта с NAFLD, или клетка, которая содержит вектор экспрессии, содержащий ген PNPLA3 или часть гена PNPLA3. Клетка, подходящая для использования в способах и вариантах применения по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка нечеловекообразного примата, например, клетку обезьяны или клетку шимпанзе), клетку животного, отличного от примата (такую как клетку коровы, клетку свиньи, клетку верблюда, клетку ламы, клетку лошади, клетку козы, клетку кролика, клетку овцы, клетку хомяка, клетку морской свинки, клетку кошки, клетку собаки, клетку крысы, клетку мыши, клетку льва, клетку тигра, клетку медведя или клетку буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека.

Экспрессия гена PNPLA3 в клетке может быть снижена по меньшей мере приблизительно на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или приблизительно на 100%.

Продуцирование белка PNPLA3 в клетке может быть снижено по меньшей мере приблизительно на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или приблизительно на 100%.

Способы и варианты применения *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей средство для RNAi, где средство для RNAi включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарно по меньшей мере на части РНК-транскрипта гена PNPLA3 млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой организм человека, композицию можно вводить любым способом, известным в данной области, включая без ограничения подкожный, внутривенный, пероральный, внутрибрюшинный или парентеральный пути, включая внутривенный путь введения (например, внутрижелудочковый, интрапаренхиматозный и интратекальный), внутримышечное, трансдермальное, введение через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и местное (включая буккальное и сублингуальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции. В одном варианте осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем инъекции вещества замедленного всасывания. При инъекции вещества замедленного всасывания средство для RNAi может высвобождаться последовательным образом в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция вещества замедленного всасывания может снижать частоту введения доз, необходимую для достижения требуемого эффекта, например, требуемого подавления PNPLA3 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция вещества замедленного всасывания может также обеспечить более постоянные концентрации в сыворотке крови. Инъекции веществ замедленного всасывания могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция вещества замедленного всасывания представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекционной помпы. Помпа может представлять собой внешнюю помпу или хирургически имплантированную помпу. В определенных вариантах осуществления помпа представляет собой подкожно имплантированную осмотическую помпу. В других вариантах осуществления помпа представляет собой инфузионную помпу. Инфузионную помпу можно использовать для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионная помпа представляет собой под-

кожную инфузионную помпу. В других вариантах осуществления помпа представляет собой хирургически имплантированную помпу, которая осуществляет доставку средства для RNAi субъекту.

Способ введения может быть выбран в зависимости от того, требуется местное или системное лечение, и в зависимости от области, подлежащей лечению. Способ и участок введения могут быть выбраны для усиления целенаправленного воздействия.

В одном аспекте настоящего изобретения также представлены способы подавления экспрессии гена PNPLA3 у млекопитающего, например, у человека. В настоящем изобретении также представлена композиция, содержащая средство для RNAi, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген PNPLA3 в клетке млекопитающего, для применения в подавлении экспрессии гена PNPLA3 у млекопитающего. В другом аспекте настоящего изобретения представлены варианты применения средства для RNAi, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген PNPLA3 в клетке млекопитающего, в производстве лекарственного препарата для подавления экспрессии гена PNPLA3 у млекопитающего.

Способы и варианты применения включают введение млекопитающему, например человеку, композиции, содержащей средство для RNAi, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген PNPLA3 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточно для достижения деградации транскрипта мРНК гена PNPLA3, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена PNPLA3 у млекопитающего.

Снижение экспрессии гена можно оценить в образце периферической крови субъекта, которому вводили средство для RNAi, при помощи любых способов, известных в данной области, например qRT-PCR, описанной в данном документе. Снижение продуцирования белка можно оценить при помощи любых способов, известных в данной области, например, при помощи ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления образец ткани служит в качестве тканевым материалом для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка PNPLA3. В другом варианте осуществления образец крови служит тканевым материалом для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка PNPLA3.

В одном варианте осуществления верификацию RISC-опосредованного расщепления мишени *in vivo* после введения средства для RNAi осуществляют с помощью 5'-RACE или модификаций из протокола, известных из уровня техники (Lasham A et al., (2010), *Nucleic Acid Res.*, 38(3), p-e19) (Zimmermann et al. (2006), *Nature*, 441:111-4).

Понятно, что все последовательности рибонуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, могут быть преобразованы в последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты путем замены тиминового основания в составе последовательности урациловым основанием. Аналогичным образом все последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, могут быть преобразованы в последовательности рибонуклеиновой кислоты путем замены урацилового основания в составе последовательности тиминным основанием. В настоящее изобретение включены последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты, последовательности рибонуклеиновой кислоты и последовательности, содержащие смеси дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов в составе всех последовательностей, раскрытых в данном документе.

Кроме того, любые последовательности нуклеиновых кислот, раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы с помощью любой комбинации химических модификаций. Специалист в данной области легко поймет, что такое обозначение, как "РНК" или "ДНК" для описания модифицированных полинуклеотидов в некоторых случаях является произвольным. Например, полинуклеотид, содержащий нуклеотид, имеющий заместитель 2'-ОН на рибозном сахаре и тиминное основание, можно описать как молекулу ДНК, имеющую модифицированный сахар (2'-ОН вместо природного атома 2'-Н ДНК) или как молекулу РНК, имеющую модифицированное основание (тимин (метилированный урацил) вместо природного урацила РНК).

Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот, представленные в данном документе, включающие без ограничения те, которые указаны в перечне последовательностей, предназначены для охвата нуклеиновых кислот, содержащих любую комбинацию природной или модифицированной РНК и/или ДНК, включая без ограничения такие нуклеиновые кислоты, имеющие модифицированные нуклеиновые основания. В качестве дополнительного примера и без ограничения полинуклеотид, имеющий последовательность "ATCGATCG", охватывает любые полинуклеотиды, имеющие такую последовательность, модифицированные или немодифицированные, включая без ограничения такие соединения, содержащие основания РНК, такие как соединения, имеющие последовательность "AUCGAUCG", и те соединения, которые имеют некоторые основания ДНК и некоторые основания РНК, такие как "AUCGATCG", а также полинуклеотиды, имеющие другие модифицированные основания, такие как "ATmeCGAUCG," где meC обозначает цитозиновое основание, содержащее метильную группу в 5-положении.

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки. Однако цитирование ссылки в данном документе не должно рассматриваться как подтверждение того, что такая ссылка является предшествующим уровнем техники для настоящего изобретения. В том случае, если любое из определений или терминов, представленных в ссылочных материалах, включенных посредством ссылки, отличается от терминов и обсуждений, представленных в данном документе, преобладающими являются термины и определения по настоящему описанию.

Эквиваленты

Вышеизложенное письменное описание считается достаточным для того, чтобы позволить специалисту в данной области реализовать настоящее изобретение на практике. В вышеизложенном описании и примерах подробно описаны некоторые предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и описан наилучший способ, предусматриваемый авторами настоящего изобретения. Однако следует иметь в виду, что независимо от того, насколько подробно вышеизложенное может появиться в тексте, настоящее изобретение может быть осуществлено многими способами, поэтому настоящее изобретение следует истолковывать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Все описанные в данном документе эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) компании Amgen и были проведены в соответствии с Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition (National Research Council (U.S.), Committee for the Update Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.) и National Academies Press (U.S.) (2011), Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Ed., National Academies Press, Washington, D.C. Мышей содержали в одном помещении в комнате с кондиционированным воздухом с температурой 22±2°C и циклом света-темноты с двенадцатичасовым освещением и двенадцатью часами темноты (0600-1800 ч). Животные имели свободный доступ к стандартному корму (Envigo, 2920X, или корм, как указано иначе) и к воде (очищенной обратным осмосом) через автоматическую поилку, если не указано иное. По окончании установленного периода кровь собирали посредством пункции сердца под глубоким наркозом, а затем, следуя рекомендациям Ассоциации по оценке и аккредитации лабораторных животных (AAALAC), животных подвергали эвтаназии вторичным физическим методом.

Пример 1. Отбор, конструирование и синтез модифицированных молекул siRNA PNPLA3.

Идентификация и отбор оптимальных последовательностей терапевтических молекул siRNA, целенаправленно воздействующих на пататин-подобный фосфолипазный домен 3 (PNPLA3), идентифицировали с использованием биоинформационного анализа транскрипта PNPLA3 человека (NM_025225.2). В табл. 1 показаны последовательности, идентифицированные как имеющие терапевтические свойства. По всей длине различных последовательностей {INVAB} обозначает инвертированное основание А, {INVDA} обозначает инвертированный дезокситимидин, GNA обозначает гликолевую нуклеиновую кислоту, dT означает дезокситимидин и dC означает дезоксицитозин.

Таблица 1

Последовательности siRNA, направленные на PNPLA3

Дуплекс №	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (смысловая)	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (антисмысловая)
D-1000	GGGCAAUAAAG UACCUGCUUU	1	AGCAGGUACUUU AUUGCCCUU	2
D-1001	CGGCCAAUGUC CACCAGCUUU	3	AGCUGGUGGACA UUGGCCGUU	4
D-1002	GGUCCAGCCUG AACUUCUUUU	5	AAGAAGUUCAGG CUGGACCUU	6
D-1003	GCUUCAUCCCC UUCUACAGUU	7	CUGUAGAAGGGG AUGAAGCUU	8
D-1004	GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	9	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	10
D-1005	GCCUCUGAGCU GAGUUGGUUU	11	ACCAACUCAGCU CAGAGGCUU	12
D-1006	GUGACAACGUA CCCUUCAUUU	13	AUGAAGGGUACG UUGUCACUU	14
D-1007	CCCGCCUCCAG GUCCCAAUUU	15	UUUGGGACCUGG AGGCGGGUU	16
D-1008	CUUCAUCCCCU UCUACAGUUU	17	ACUGUAGAAGGG GAUGAAGUU	18

D-1009	GGUAUGUCCU GCUUCAUGUU	19	CAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	20
D-1010	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU	21	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	22
D-1011	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUU	23	GGCAUGAAGCAG GAACAUUU	24
D-1012	AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	25	GGGCAUGAAGCA GGAACAUUU	26
D-1013	UGUCCUGCUU CAUGCCUUU	27	AGGGCAUGAAGC AGGAACAUU	28
D-1014	GUCCUGCUUC AUGCCUUUU	29	AAGGGCAUGAAG CAGGAACUU	30
D-1015	UCCUGCUUCA UGCCCUUCUU	31	GAAGGGCAUGAA GCAGGAAUU	32
D-1016	UCCUGCUUCA GCCCUUCUUU	33	AGAAGGGCAUGA AGCAGGAUU	34
D-1017	CCUGCUUCAUG CCCUUCUAUU	35	UAGAAGGGCAUG AAGCAGGUU	36
D-1018	CUGCUUCAUGC CCUUCUACUU	37	GUAGAAGGGCAU GAAGCAGUU	38
D-1019	UGCUUCAUGCC CUUCUACAUU	39	UGUAGAAGGGCA UGAAGCAUU	40
D-1020	GCUUCAUGCCC UUCUACAGUU	41	CUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	42
D-1021	CUUCAUGCCCU UCUACAGUUU	43	ACUGUAGAAGGG CAUGAAGUU	44
D-1022	UUCAUGCCCU CUACAGUGUU	45	CACUGUAGAAGG GCAUGAAUU	46
D-1023	UCAUGCCCUUC UACAGUGGUU	47	CCACUGUAGAAG GGCAUGAUU	48

D-1024	CAUGCCCUUCU ACAGUGGCCUU	49	GCCACUGUAGAA GGGCAUGUU	50
D-1025	AUGCCCUUCUA CAGUGGCCUU	51	GGCCACUGUAGA AGGGCAUUU	52
D-1026	UGCCCUUCUAC AGUGGCCUUU	53	AGGCCACUGUAG AAGGGCAUU	54
D-1027	GCCCUUCUACA GUGGCCUUUU	55	AAGGCCACUGUA GAAGGGCUU	56
D-1028	GGUAUGUCCU GCUUCAUCUU	57	GAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	58
D-1029	GUAUGUCCUG CUUCAUCUU	59	GGAUGAAGCAGG AACAUACUU	60
D-1030	UAUGUCCUGC UUCAUCCUU	61	GGGAUGAAGCAG GAACAUAUU	62
D-1031	AUGUCCUGCU UCAUCCCUU	63	GGGAUGAAGCA GGAACAUUU	64
D-1032	UGUCCUGCUU CAUCCCUUU	65	AGGGGAUGAAGC AGGAACAUU	66
D-1033	GUCCUGCUUC AUCCCUUUU	67	AAGGGGAUGAAG CAGGAACUU	68
D-1034	UCCUGCUUCA UCCCUUCUU	69	GAAGGGGAUGAA GCAGGAAUU	70
D-1035	UCCUGCUUCA CCCUUCUUU	71	AGAAGGGGAUGA AGCAGGAUU	72
D-1036	CCUGCUUCAUC CCCUUCUAUU	73	UAGAAGGGGAUG AAGCAGGUU	74
D-1037	CUGCUUCAUCC CCUUCUACUU	75	GUAGAAGGGGAU GAAGCAGUU	76
D-1038	UGCUUCAUCCC CUUCUACAUU	77	UGUAGAAGGGGA UGAAGCAUU	78

D-1039	UUCAUCCCCU CUACAGUGUU	79	CACUGUAGAAGG GGAUGAAUU	80
D-1040	UCAUCCCCUUC UACAGUGGUU	81	CCACUGUAGAAG GGGAUGAAU	82
D-1041	CAUCCCCUUCU ACAGUGGCUU	83	GCCACUGUAGAA GGGAUGUU	84
D-1042	UCCCCUUCUAC AGUGGCCUUU	85	AGGCCACUGUAG AAGGGGAUU	86
D-1043	GAUCAGGACCC GAGCCGAUUU	87	AUCGGCUCGGGU CCUGAUCUU	88
D-1044	UGGGCUUCUAC CACGUCGUUU	89	ACGACGUGGUAG AAGCCCAUU	90
D-1045	GAGCGAGCACG CCCCGAUUU	91	AUGCGGGGCGUG CUCGCUCUU	92
D-1046	UGCACUGCGUC GGCGUCCUUU	93	AGGACGCCGACG CAGUGCAUU	94
D-1047	UGGAGCAGACU CUGCAGGUUU	95	ACCUGCAGAGUC UGCUCCAUU	96
D-1048	UGCAGGUCCUC UCAGAUCUUU	97	AGAUCUGAGAGG ACCUGCAUU	98
D-1049	CCCGGCCAAUG UCCACCAUUU	99	AUGGUGGACAUU GGCCGGGUU	100
D-1050	UUCUACAGUGG CCUUAUCUUU	101	AGAUAAAGGCCAC UGUAGAAUU	102
D-1051	UCUACAGUGGC CUUAUCCUUU	103	AGGAUAAGGCCA CUGUAGAAU	104
D-1052	CUUCCUUCAGA GGCGUGCUUU	105	AGCACGCCUCUG AAGGAAGUU	106
D-1053	UUCUUCAGAG GCGUGCGAAU	107	UCGCACGCCUCU GAAGGAUU	108

D-1054	GCGUGCGAUAU GUGGAUGUUU	109	ACAUCCACAUAU CGCACGCUU	110
D-1055	CGUGCGAUAUG UGGAUGGAUU	111	UCCAUCCACAU UCGCACGUU	112
D-1056	UGGAUGGAGGA GUGAGUGAUU	113	UCACUCACUCCUC CAUCCAUU	114
D-1057	ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	115	ACAUCAUAUGAAG GGUACGUUU	116
D-1058	UGGACAUCACC AAGCUCAUUU	117	AUGAGCUUGGUG AUGUCCAUU	118
D-1059	CACCUGCGUCU CAGCAUCUUU	119	AGAUGCUGAGAC GCAGGUGUU	120
D-1060	ACCUGCGUCUC AGCAUCCUUU	121	AGGAUGCUGAGA CGCAGGUUU	122
D-1061	CCAGAGACUGG UGACAUGUUU	123	ACAUGUCACCAG UCUCUGGUU	124
D-1062	AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	125	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	126
D-1063	CCGCCUCCAGG UCCCAAAUUU	127	AUUUGGGACCUG GAGGCGGUU	128
D-1064	UACCUGCUGGU GCUGAGGUUU	129	ACCUCAGCACCA GCAGGUAUU	130
D-1065	ACCUGCUGGUG CUGAGGGUUU	131	ACCCUCAGCACCA GCAGGUUU	132
D-1066	CUCUCCACCUU UCCCAGUUUU	133	AACUGGGAAAAGG UGGAGAGUU	134
D-1067	UUUUUCACCUA ACUAAAAUUU	135	AUUUUAGUUAGG UGAAAAAUU	136
D-1068	CGGCCAAUGUC CACCAGCUUU	137	AGCUGGUGGACA UUGGCCGUU	138

D-1069	GGUCCAGCCUG AACUUCUUUU	139	AAGAAGUUCAGG CUGGACCUU	140
D-1070	GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	141	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	142
D-1071	GUGACAACGUA CCCUUCAUUU	143	AUGAAGGGUACG UUGUCACUU	144
D-1072	GGUAUGUCCU GCUUCAUGUU	145	CAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	146
D-1073	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU	147	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	148
D-1074	UGUCCUGCUU CAUGCCUUU	149	AGGGCAUGAAGC AGGAACAUU	150
D-1075	GUUCCUGCUUC AUGCCUUUU	151	AAGGGCAUGAAG CAGGAACUU	152
D-1076	CCUGCUUCAUG CCCUUCUAUU	153	UAGAAGGGCAUG AAGCAGGUU	154
D-1077	GCUUCAUGCCC UUCUACAGUU	155	CUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	156
D-1078	CUUCAUGCCCU UCUACAGUUU	157	ACUGUAGAAGGG CAUGAAGUU	158
D-1079	UUCAUGCCCUU CUACAGUGUU	159	CACUGUAGAAGG GCAUGAAUU	160
D-1080	AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	161	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	162
D-1081	AUGCCCUUCUA CAGUGGCCUU	163	GGCCACUGUAGA AGGGCAUUU	164
D-1082	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	165	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	166
D-1083	GGAAAGACUGU UCCAAAAAUU	333	UUUUUGGAACAG UCUUUCCUU	334

D-1084	GGUAUGUCCU GCUUCAUGUU	335	CAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	336
D-1085	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU	337	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	338
D-1086	UGUCCUGCUU CAUGCCUUU	339	AGGGCAUGAAGC AGGAACAUU	340
D-1087	GCUUCAUGCCC UUCUACAGUU	341	CUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	342
D-1088	CUUCAUGCCCU UCUACAGUUU	343	ACUGUAGAAGGG CAUGAAGUU	344
D-1089	GCGGCUCCUG GGCUUCUAUU	345	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	346
D-1090	GUCCUGCUUC AUGCCUUUU	347	AAGGGCAUGAAG CAGGAACUU	348
D-1091	AUGGCUCCAG AUAUGCCUUU	349	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	350
D-1092	CCUGCUUCAUG CCCUUCUAUU	351	UAGAAGGGCAUG AAGCAGGUU	352
D-1093	UUCAUGCCCUU CUACAGUUUU	353	AACUGUAGAAGG GCAUGAAUU	354
D-1094	UUCAUGCCCUU CUACAGUGUU	355	CACUGUAGAAGG GCAUGAAUU	356
D-1095	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	357	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	358
D-1096	GGUCCAGCCUG AACUUCUUUU	359	AAGAAGUUCAGG CUGGACCUU	360
D-1097	GCGGCUCCUG GGCUUCUAUU	361	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	362
D-1098	GCGGCUCCUG GGCUUCUAUU	363	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	364

D-1099	GUUCCUGCUUC AUGCCCUUUU	365	AAGGGCAUGAAG CAGGAACUU	366
D-1100	GUUCCUGCUUC AUGCCCUUUU	367	AAGGGCAUGAAG CAGGAACUU	368
D-1101	CCUGCUUCAUG CCCUUCUAUU	369	UAGAAGGGCAUG AAGCAGGUU	370
D-1102	CCUGCUUCAUG CCCUUCUAUU	371	UAGAAGGGCAUG AAGCAGGUU	372
D-1103	AUGCCCUUCUA CAGUGGCCUU	373	GGCCACUGUAGA AGGGCAUUU	374
D-1104	AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	375	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	376
D-1105	GUGACAACGUA CCCUUCAUUU	377	AUGAAGGGUACG UUGUCACUU	378
D-1106	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU	379	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	380
D-1107	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU	381	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	382
D-1108	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU	383	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	384
D-1109	GUAUGUCCUG CUUCAUGCCU	385	AGGCAUGAAGCA GGAACAUACUU	386
D-1110	UGGUAUGUCC UGCUUCAUGU	387	GCAUGAAGCAGG AACAUACCAUU	388
D-1111	GUAUGUCCUG CUUCAUGU	389	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	390
D-1112	GUAUGUCCUG CUUCAUGC{INV AB}	391	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	392
D-1113	GCUUCAUGCCC	393	AUGUAGAAGGGC	394

	UUCUACAUUU		AUGAAGCUU	
D-1114	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	395	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	396
D-1115	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	397	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	398
D-1116	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	399	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	400
D-1117	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	401	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	402
D-1118	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	403	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	404
D-1119	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	405	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	406
D-1120	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	407	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	408
D-1121	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	409	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	410
D-1122	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	411	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	412
D-1123	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	413	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	414
D-1124	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	415	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	416
D-1125	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	417	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	418
D-1126	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	419	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	420
D-1127	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	421	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	422
D-1128	GCUUCAUGCCC	423	AUGUAGAAGGGC	424

	UUCUACAUUU		AUGAAGCUU	
D-1129	GCUUCAUG[DC] CCUUCUACAUU U	425	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	426
D-1130	GCUUCAUGCC[DC]UUCUACA UU	427	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	428
D-1131	GCUUCAUGC[D C]CUUCUACA UU	429	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	430
D-1132	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	431	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	432
D-1133	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	433	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	434
D-1134	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	435	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	436
D-1135	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	437	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	438
D-1136	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	439	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	440
D-1137	GCUUCAUGCCC UUCUACAGUU	441	AACUGUAGAAGG GCAUGAAGCUU	442
D-1138	CUGCUUCAUGC CCUUCUACA	443	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCAGUU	444
D-1139	GCUUCAUGCCC UUCUACA	445	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	446
D-1140	GCUUCAUGCCC UUCUACA{INV AB}	447	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	448
D-1141	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU{I	449	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	450

	NVAB}			
D-1142	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	451	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	452
D-1143	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	453	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	454
D-1144	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	455	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	456
D-1145	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	457	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	458
D-1146	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	459	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	460
D-1147	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	461	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	462
D-1148	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	463	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	464
D-1149	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	465	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	466
D-1150	GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	467	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	468
D-1151	GUAUGUCCUG CUUCAUGCUU{I NVAB}	469	GCAUGAAGCAGG AACAUACUU	470
D-1152	GGUAUGUCCU GCUUCAUUUU	471	AAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	472
D-1153	GUAUGUCCUG CUUCAUGUUU	473	ACAUGAAGCAGG AACAUACUU	474
D-1154	CGGCCAAUGUC CACCAGCUUU	475	AGCUGGUGGACA UUGGCCGUU	476
D-1155	UGGAGCAGACU CUGCAGGUUU	477	ACCUGCAGAGUC UGCUCCAUU	478

D-1156	ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	479	ACAUCA AUGAAG GGUACGUUU	480
D-1157	CCAGAGACUGG UGACAUGUUU	481	ACAUGUCACCAG UCUCUGGUU	482
D-1158	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	483	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	484
D-1159	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	485	AAAUGUAGAAAG GCAUGAAGCUU	486
D-1160	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	487	AAAUGUAGAAAG GCAUGAAGCUU	488
D-1161	UGCUUCAUGCC UUUCUACA AU	489	UGUAGAAAGGCA UGAAGCAUU	490
D-1162	UAUGUCCUGC UUCAUGCUUU	491	AGCAUGAAGCAG GAACAUAUU	492
D-1163	UUCUGCUUCA UGCCUUUUUU	493	AAAAGGCAUGAA GCAGGAAUU	494
D-1164	UCAUGCCUUUC UACAGUGUUU	495	ACACUGUAGAAA GGCAUGAUU	496
D-1165	CAUGCCUUUCU ACAGUGGUUU	497	ACCACUGUAGAA AGGCAUGUU	498
D-1166	AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	499	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	500
D-1167	GGUAUGUCCU GCUUCAUAUU	501	UAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	502
D-1168	GUAUGUCCUG CUUCAUGAUU	503	UCAUGAAGCAGG AACAUACUU	504
D-1169	UAUGUCCUGC	505	UGCAUGAAGCAG	506

	UUCAUGCAUU		GAACAUUU	
D-1170	UUCCUGCUUCA UGCCUUUAUU	507	UAAAGGCAUGAA GCAGGAAUU	508
D-1171	CUGCUUCAUGC CUUUCUAAUU	509	UUAGAAAGGCAU GAAGCAGUU	510
D-1172	GCUUCAUGCCU UUCUACAAUU	511	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	512
D-1173	UUCAUGCCUUU CUACAGUAUU	513	UACUGUAGAAAG GCAUGAAUU	514
D-1174	UCAUGCCUUUC UACAGUGAUU	515	UCACUGUAGAAA GGCAUGAUU	516
D-1175	CAUGCCUUUCU ACAGUGGAUU	517	UCCACUGUAGAA AGGCAUGUU	518
D-1176	AUGCCUUUCUA CAGUGGCAUU	519	UGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	520
D-1177	ACGUACCCUUC AUUGAUGAUU	521	UCAUCAUGAAG GGUACGUUU	522
D-1178	CCAGAGACUGG UGACAUGAUU	523	UCAUGUCACCAG UCUCUGGUU	524
D-1179	AUGGCUUCCAG AU AUGCCA UU	525	UGGCAUAUCUGG AAGCCA UUU	526
D-1180	GUUCCUGCUUC AUGCCUUUUU	527	AAAGGCAUGAAG CAGGAACUU	528
D-1181	CCUGCUUCAUG CCUUUCUAUU	529	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGUU	530
D-1182	GCUUCAUGCCU UUCUACA UUU	531	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	532
D-1183	CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	533	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	534
D-1184	UUCAUGCCUUU	535	AACUGUAGAAAG	536

	CUACAGUUUU		GCAUGAAUU	
D-1185	GCUUCAUCCU UUCUACAUUU	537	AUGUAGAAAGGG AUGAAGCUU	538
D-1186	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	539	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	540
D-1187	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	541	AAAUGUAGAAGG GCAUGAAGCUU	542
D-1188	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	543	AAAUGUAGAAGG GCAUGAAGCUU	544
D-1189	[INVAB]GCGGC UUCCUGGGCUU CUAAU	545	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	546
D-1190	[INVAB]CUGCG GCUUCCUGGGC UUCUA	547	UAGAAGCCCAGG AAGCCGAGUU	548
D-1191	CUGCGGCUUCC UGGGCUUCU{IN VAB}	549	UAGAAGCCCAGG AAGCCGAGUU	550
D-1192	[INVAB]CUGCG GCUUCCUGGGC UUCUA	551	UAGAAGCCCAGG AAGCCGAGUU	552
D-1193	[INVAB]GCGGC UUCCUGGGCUU CUAAU	553	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	554
D-1194	CUGCGGCUUCC UGGGCUUCU{IN VAB}	555	UAGAAGCCCAGG AAGCCGAGUU	556
D-1195	[INVAB]CUGCG	557	UAGAAGCCCAGG	558

	GCUUCCUGGGC UUCUA		AAGCCGCAGUU	
D-1196	[INVAB]GCGGC UUCCUGGGCUU CUAAU	559	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	560
D-1197	CUGCGGCUUCC UGGGCUUCU{IN VAB}	561	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCAGUU	562
D-1198	[INVAB]CUGCG GCUUCCUGGGC UUCUA	563	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCAGUU	564
D-1199	[INVAB]GCGGC UUCCUGGGCUU CUAAU	565	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	566
D-1200	[INVAB]CUGCG GCUUCCUGGGC UUCUA	567	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCAGUU	568
D-1201	[INVAB]CUGCG GCUUCCUGGGC UUCUA	569	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCAGUU	570
D-1202	[INVAB]CUGCG GCUUCCUGGGC UUCUA	571	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCAGUU	572
D-1203	[INVAB]AUGGC UCCAGAU AUG CCUUU	573	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	574
D-1204	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	575	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	576
D-1205	ACAUGGCUUCC AGAU AUGCC{IN VAB}	577	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	578

D-1206	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	579	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	580
D-1207	[INVAB]AUGGC UCCAGAU CCUUU	581	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	582
D-1208	ACAUGGCUUCC AGAU AUGCC{IN VAB}	583	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	584
D-1209	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	585	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	586
D-1210	[INVAB]AUGGC UCCAGAU CCUUU	587	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	588
D-1211	ACAUGGCUUCC AGAU AUGCC{IN VAB}	589	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	590
D-1212	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	591	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	592
D-1213	[INVAB]AUGGC UCCAGAU CCUUU	593	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	594
D-1214	ACAUGGCUUCC AGAU AUGCC{IN VAB}	595	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	596
D-1215	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	597	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	598
D-1216	[INVAB]ACAUG	599	AGGCAUAUCUGG	600

	GCUUCCAGUA UGCCU		AAGCCAUGUUU	
D-1217	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGUA UGCCU	601	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	602
D-1218	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGUA UGCCU	603	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	604
D-1219	[INVAB]ACGUA CCCUUCAUUGA UGUUU	605	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUU	606
D-1220	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	607	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	608
D-1221	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	609	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	610
D-1222	[INVAB]ACGUA CCCUUCAUUGA UGUUU	611	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUU	612
D-1223	CAACGUACCCU UCAUUGAUG{I NVAB}	613	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	614
D-1224	[INVAB]ACGUA CCCUUCAUUGA UGUUU	615	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUU	616
D-1225	CAACGUACCCU UCAUUGAUG{I NVAB}	617	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	618
D-1226	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	619	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	620

D-1227	[INVAB]ACGUA CCCUUCAUUGA UGUUU	621	ACAUCAAAUGAAG GGUACGUUU	622
D-1228	CAACGUACCCU UCAUUGAUG{I NVAB}	623	ACAUCAAAUGAAG GGUACGUUGUU	624
D-1229	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	625	ACAUCAAAUGAAG GGUACGUUGUU	626
D-1230	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	627	ACAUCAAAUGAAG GGUACGUUGUU	628
D-1231	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	629	ACAUCAAAUGAAG GGUACGUUGUU	630
D-1232	[INVAB]CAACG UACCCUUCAUU GAUGU	631	ACAUCAAAUGAAG GGUACGUUGUU	632
D-1233	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	633	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	634
D-1234	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	635	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	636
D-1235	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	637	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	638
D-1236	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	639	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	640
D-1237	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	641	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	642
D-1238	CUGCUUCAUGC	643	AUGUAGAAAGGC	644

	CUUUCUACAU		AUGAAGCAGUU	
D-1239	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	645	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	646
D-1240	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	647	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	648
D-1241	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	649	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	650
D-1242	[INVAB]CUGCU UCAUGC[DC]UU UCUACAU	651	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	652
D-1243	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	653	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	654
D-1244	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	655	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	656
D-1245	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	657	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	658
D-1246	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	659	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	660
D-1247	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	661	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	662
D-1248	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	663	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	664
D-1249	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	665	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	666

D-1250	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	667	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	668
D-1251	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	669	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	670
D-1252	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	671	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	672
D-1253	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	673	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	674
D-1254	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	675	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	676
D-1255	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	677	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	678
D-1256	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	679	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	680
D-1257	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	681	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	682
D-1258	CUGCUUCAUGC CCUUCUACAU	683	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCAGUU	684
D-1259	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	685	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	686
D-1260	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA	687	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	688

	CAUUU			
D-1261	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	689	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	690
D-1262	CUGCUUCAUGC CCUUCUACA{IN VAB}	691	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCAGUU	692
D-1263	[INVAB]CUGCU UCAUGCCCUUC UACAU	693	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCAGUU	694
D-1264	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	695	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	696
D-1265	AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	697	AGGCAUGAAGCA GGAACAUUU	698
D-1266	UGUCCUGCUU CAUGCCUUUU	699	AAGGCAUGAAGC AGGAACAUU	700
D-1267	UGCCUUUCUAC AGUGGCCUUU	701	AGGCCACUGUAG AAAGGCAUU	702
D-1268	CGUACUUCGUC CUUGUAUGUU	703	CAUACAAGGACG AAGUACGUU	704
D-1269	[INVAB]GCUUC AUGC[DC]CUUC UACAUUU	705	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	706
D-1270	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	707	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	708
D-1271	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	709	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	710
D-1272	[INVAB]GCUUC	711	AUGUAGAAGGGC	712

	AUGCCCUUCUA CAUUU		AUGAAGCUU	
D-1273	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	713	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	714
D-1274	[INVAB]GCUUC AUGCCCUUCUA CAUUU	715	AUGUAGAAGGGC AUGAAGCUU	716
D-1275	[INVAB]CCUGC UUCAUGCCUUU CUAAU	717	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGUU	718
D-1276	[INVAB]CCUGC UUCAUGCCUUU CUAAU	719	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGUU	720
D-1277	UUCCUGCUUCA UGCCUUUCU{IN VAB}	721	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	722
D-1278	[INVAB]CCUGC UUCAUGCCUUU CUAAU	723	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGUU	724
D-1279	UUCCUGCUUCA UGCCUUUCU{IN VAB}	725	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	726
D-1280	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	727	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	728
D-1281	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	729	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	730
D-1282	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	731	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	732

D-1283	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	733	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	734
D-1284	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	735	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	736
D-1285	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	737	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	738
D-1286	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	739	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	740
D-1287	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	741	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	742
D-1289	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	743	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	744
D-1290	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	745	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	746
D-1291	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	747	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	748
D-1292	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	749	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	750
D-1293	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	751	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	752
D-1294	[INVAB]UGCUU	753	ACUGUAGAAAGG	754

	CAUGCCUUUCU ACAGU		CAUGAAGCAUU	
D-1295	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	755	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	756
D-1296	[INVAB]GUUCC UGCUUCAUGCC UUUUU	757	AAAGGCAUGAAG CAGGAACUU	758
D-1297	[INVAB]CCUGC UUCAUGCCUUU CUAAU	759	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGUU	760
D-1298	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	761	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	762
D-1299	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	763	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	764
D-1300	UUCCUGCUUCA UGCCUUUCU{IN VAB}	765	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	766
D-1301	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	767	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	768
D-1302	UUCCUGCUUCA UGCCUUUCU{IN VAB}	769	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	770
D-1303	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	771	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	772
D-1304	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	773	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	774

D-1305	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	775	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	776
D-1306	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	777	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	778
D-1307	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	779	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	780
D-1308	[INVAB]UUCCU GCUUCAUGCCU UUCUA	781	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGAAUU	782
D-1309	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	783	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	784
D-1310	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	785	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	786
D-1311	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	787	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	788
D-1312	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	789	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	790
D-1313	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	791	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	792
D-1314	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	793	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	794
D-1315	UCAUGCCUUUC	795	AGCCACUGUAGA	796

	UACAGUGGC{INVAB}		AAGGCAUGAUU	
D-1316	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	797	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	798
D-1317	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	799	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	800
D-1318	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	801	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	802
D-1319	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	803	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	804
D-1320	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	805	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	806
D-1321	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	807	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	808
D-1322	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	809	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	810
D-1323	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	811	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	812
D-1324	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	813	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	814
D-1325	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	815	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	816

D-1326	[INVAB]CAUGC CUUUCUACAGU GGUUU	817	ACCACUGUAGAA AGGCAUGUU	818
D-1327	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UAAUU	819	UUAGAAAGGCAU GAAGCAGUU	820
D-1328	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAAUU	821	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	822
D-1329	[INVAB]UUCAU GCCUUUCUACA GUAUU	823	UACUGUAGAAAG GCAUGAAUU	824
D-1330	[INVAB]GUUCC UGCUUCAUGCC UUUUU	825	AAAGGCAUGAAG CAGGAACUU	826
D-1331	AUGUCCUGCU UCAUGCCUU{IN VAB}	827	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	828
D-1332	[INVAB]AUGUU CCUGCUUCAUG CCUUU	829	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	830
D-1333	[INVAB]GUUCC UGCUUCAUGCC UUUUU	831	AAAGGCAUGAAG CAGGAACUU	832
D-1334	AUGUCCUGCU UCAUGCCUU{IN VAB}	833	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	834
D-1335	[INVAB]AUGUU CCUGCUUCAUG CCUUU	835	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	836
D-1336	[INVAB]GUUCC	837	AAAGGCAUGAAG	838

	UGCUUCAUGCC UUUUU		CAGGAACUU	
D-1337	AUGUUCUGCU UCAUGCCUU{IN VAB}	839	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	840
D-1338	[INVAB]AUGUU CCUGCUUCAUG CCUUU	841	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	842
D-1339	[INVAB]AUGUU CCUGCUUCAUG CCUUU	843	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	844
D-1340	[INVAB]AUGUU CCUGCUUCAUG CCUUU	845	AAAGGCAUGAAG CAGGAACAUUU	846
D-1341	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAGUA	847	UACUGUAGAAAG GCAUGAAGCUU	848
D-1342	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAGUA	849	UACUGUAGAAAG GCAUGAAGCUU	850
D-1343	[INVAB]UUCAU GCCUUUCUACA GUAUU	851	UACUGUAGAAAG GCAUGAAUU	852
D-1344	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAGUA	853	UACUGUAGAAAG GCAUGAAGCUU	854
D-1345	GCUUCAUGCCU UUCUACAGU{IN VAB}	855	UACUGUAGAAAG GCAUGAAGCUU	856
D-1346	[INVAB]GCGGC UUCUGGGCUU CUAAU	857	UAGAAGCCCAGG AAGCCGCUU	858

D-1347	[INVAB]AUGGC UCCAGAU AUG CCUUU	859	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUUU	860
D-1348	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	861	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	862
D-1349	[INVAB]ACAUG GCUUCCAGAU UGCCU	863	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	864
D-1350	[INVAB]CAACG UACCCUUCAU GAUGU	865	ACAUCA AUGAAG GGUACGUUGUU	866
D-1351	[INVAB]CAACG UACCCUUCAU GAUGU	867	ACAUCA AUGAAG GGUACGUUGUU	868
D-1352	[INVAB]ACGUA CCCUUCAUGA UGUUU	869	ACAUCA AUGAAG GGUACGUUU	870
D-1353	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	871	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	872
D-1354	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	873	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	874
D-1355	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	875	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	876
D-1356	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	877	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	878
D-1357	[INVAB]CUGCU	879	AUGUAGAAAGGC	880

	UCAUGCCUUUC UACAU		AUGAAGCAGUU	
D-1358	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	881	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	882
D-1359	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	883	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	884
D-1360	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	885	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	886
D-1361	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	887	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	888
D-1362	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	889	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	890
D-1363	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	891	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	892
D-1364	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	893	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	894
D-1365	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	895	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	896
D-1366	[INVAB]CUUCA UCCUUUCUAC AGUUU	897	ACUGUAGAAAGG GAUGAAGUU	898
D-1367	[INVAB]GCUUC AUCCUUUCUA CAUUU	899	AUGUAGAAAGGG AUGAAGCUU	900

D-1368	UGCUUCAUCCC UUUCUACAG{IN VAB}	901	ACUGUAGAAAGG GAUGAAGCAUU	902
D-1369	CUGCUUCAUCC CUUUCUACA{IN VAB}	903	AUGUAGAAAGGG AUGAAGCAGUU	904
D-1370	[INVAB]ACAUU GCUCUUUCACC UGAUU	905	UCAGGUGAAAGA GCAAUGUUU	906
D-1371	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	907	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	908
D-1372	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	909	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	910
D-1373	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	911	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	912
D-1374	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	913	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	914
D-1375	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	915	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	916
D-1376	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	917	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	918
D-1377	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	919	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	920
D-1378	CUGCUUCAUGC	921	AUGUAGAAAGGC	922

	CUUUCUACA{INVAB}		AUGAAGCAGUU	
D-1379	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	923	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	924
D-1380	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	925	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	926
D-1381	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	927	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	928
D-1381	[INVAB]CUUCA UGCC[DT]UUCU ACAGUUU	929	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	930
D-1382	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	931	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	932
D-1383	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	933	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	934
D-1384	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	935	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	936
D-1385	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	937	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	938
D-1386	[INVAB]CUUCA UGC[DC]UUUCU ACAGUUU	939	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	940
D-1387	[INVAB]CUUCA UGCCU[DT]UCU ACAGUUU	941	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	942

D-1388	[INVAB]GCUUC AUGGGAUUCUA CAUUU	943	AUGUAGAAUCCC AUGAAGCUU	944
D-1389	[INVAB]CUUCA UGCGAAUCUAC AGUUU	945	ACUGUAGAUUCG CAUGAAGUU	946
D-1390	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	947	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	948
D-1391	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAA	949	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	950
D-1392	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VDA}	951	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	952
D-1393	CUGCUUCAUGG GAUUCUACA{IN VAB}	953	AUGUAGAAUCCC AUGAAGCAGUU	954
D-1394	[INVAB]CUGCU UCAUGGGAUUC UACAU	955	AUGUAGAAUCCC AUGAAGCAGUU	956
D-1395	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	957	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	958
D-1396	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	959	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	960
D-1397	[INVAB]GCUUC AUGCCUUUCUA CAUUU	961	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	962
D-1398	[INVAB]UGCUU	963	ACUGUAGAAAGG	964

	CAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}		CAUGAAGCAUU	
D-1399	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	965	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	966
D-1400	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	967	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	968
D-1401	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	969	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	970
D-1402	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	971	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	972
D-1403	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	973	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	974
D-1404	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	975	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	976
D-1405	AUGCCUUUCUA CAGUGGCUU{IN VAB}	977	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	978
D-1406	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	979	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	980
D-1407	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	981	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	982
D-1408	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	983	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	984

D-1409	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCU	985	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	986
D-1410	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	987	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	988
D-1411	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCUUU	989	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	990
D-1412	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	991	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	992
D-1413	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	993	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	994
D-1414	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	995	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	996
D-1415	[INVAB]AUGCC UUUCUACAGUG GCAUU	997	UGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	998
D-1416	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	999	UGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1000
D-1417	[INVAB]UCAUG CCUUUCUACAG UGGCA	1001	UGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1002
D-1418	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VDA}	1003	UGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1004
D-1419	CUGCUUCAUGC	1005	AUGUAGAAAGGC	1006

	CUUUCUACA{IN VAB}		AUGAAGCAGUU	
D-1420	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1007	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1008
D-1421	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VDA}	1009	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1010
D-1422	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	1011	UGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1012
D-1423	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VDA}	1013	UGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1014
D-1424	[INVAB]CUUCA UGCCUUUCUAC AGUUU	1015	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	1016
D-1425	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1017	AUGUA[AB]AAAG GCAUGAAGCAGU U	1018
D-1426	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1019	AUGUA[AB]AAAG GCAUGAAGCAGU U	1020
D-1427	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	1021	ACUGU[AB]GAAA GGCAUGAAGCAU U	1022
D-1428	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VAB}	1023	ACUGU[AB]GAAA GGCAUGAAGCAU U	1024
D-1429	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	1025	AGCCA[AB]UGUA GAAAGGCAUGAU U	1026

D-1430	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	1027	AGCCA[AB]UGUA GAAAGGCAUGAU U	1028
D-1431	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1029	AU[GNA- G]UAGAAAGGCAU GAAGCAGUU	1030
D-1432	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1031	AUG[GNA- U]AGAAAGGCAUG AAGCAGUU	1032
D-1433	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1033	AUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGA AGCAGUU	1034
D-1434	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1035	AUGUA[GNA- G]AAAGGCAUGAA GCAGUU	1036
D-1435	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1037	AUGUAG[GNA- A]AAGGCAUGAAG CAGUU	1038
D-1436	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1039	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1040
D-1437	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1041	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1042
D-1438	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	1043	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1044
D-1439	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1045	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1046
D-1440	CUGCUUCAUGC	1047	AUGUAGAAAGGC	1048

	CUUUCUACA{INVAB}		AUGAAGCAGUU	
D-1441	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1049	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1050
D-1442	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	1051	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1052
D-1443	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1053	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1054
D-1444	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1055	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1056
D-1445	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACAU	1057	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1058
D-1446	[INVAB]CUGCU UCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1059	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1060
D-1447	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1061	A[AB]GUAGAAAG GCAUGAAGCAGU U	1062
D-1448	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1063	AU[AB]UAGAAAG GCAUGAAGCAGU U	1064
D-1449	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1065	AUG[AB]AGAAAG GCAUGAAGCAGU U	1066
D-1450	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1067	AUGU[AB]GAAAG GCAUGAAGCAGU U	1068

D-1451	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1069	AUGUAG[AB]AAG GCAUGAAGCAGU U	1070
D-1452	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1071	AUGUAGA[AB]AG GCAUGAAGCAGU U	1072
D-1453	CAACGUACCCU UCAUUGAUG{I NVAB}	1073	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	1074
D-1454	CAACGUACCCU UCAUUGAUG{I NVAB}	1075	ACAUCAAUGAAG GGUACGUUGUU	1076
D-1455	ACAUGGCUUCC AGAUAUGCC{IN VAB}	1077	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	1078
D-1456	ACAUGGCUUCC AGAUAUGCC{IN VAB}	1079	AGGCAUAUCUGG AAGCCAUGUUU	1080
D-1457	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1081	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1082
D-1458	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1083	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1084
D-1459	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1085	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1086
D-1460	CUGCGGCUUCC UGGGCUUCU{IN VAB}	1087	UAGAAGCCCAGG AAGCCGAGUU	1088
D-1461	CUGCGGCUUCC	1089	UAGAAGCCCAGG	1090

	UGGGCUUCU{INVAB}		AAGCCGCAGUU	
D-1462	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1091	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1092
D-1463	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAGU	1093	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1094
D-1464	[INVAB]UGCUU CAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1095	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1096
D-1465	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1097	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1098
D-1466	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1099	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1100
D-1467	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1101	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1102
D-1468	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	1103	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1104
D-1469	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	1105	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1106
D-1470	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	1107	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1108
D-1471	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1109	UCUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1110
D-1472	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1111	UCUGUAGAAAGG CAUGAAGCAUU	1112

	VDA}			
D-1473	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VDT}	1113	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1114
D-1474	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1115	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1116
D-1475	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1117	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1118
D-1476	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1119	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1120
D-1477	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1121	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1122
D-1478	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1123	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1124
D-1479	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1125	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1126
D-1480	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1127	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1128
D-1481	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1129	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1130
D-1482	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1131	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1132

D-1483	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1133	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1134
D-1484	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1135	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1136
D-1485	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1137	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1138
D-1486	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1139	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1140
D-1487	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1141	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1142
D-1488	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1143	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1144
D-1489	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1145	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1146
D-1490	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1147	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1148
D-1491	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1149	AUGUAGA[GNA- A]A[DG]GCAUGAA GCAGUU	1150
D-1492	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1151	AUGUAGA[GNA- A][DA]GGCAUGAA GCAGUU	1152
D-1493	CUGCUUCAUGC	1153	AUGUAGA[GNA-	1154

	CUUUCUACA{IN VAB}		A]AG[DG]CAUGAA GCAGUU	
D-1494	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1155	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1156
D-1495	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1157	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1158
D-1496	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1159	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1160
D-1497	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1161	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1162
D-1498	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1163	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1164
D-1499	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1165	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1166
D-1500	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1167	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCAGUU	1168
D-1501	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1169	U[GNA- C]UGUAGAAAGGC AUGAAGCAUU	1170
D-1502	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1171	UC[GNA- U]GUAGAAAGGCA UGAAGCAUU	1172
D-1503	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1173	UCUG[GNA- U]AGAAAGGCAUG AAGCAUU	1174

D-1504	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1175	UCUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGA AGCAUU	1176
D-1505	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1177	UCUGUAG[GNA- A]AAGGCAUGAAG CAUU	1178
D-1506	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1179	U[AB]UGUAGAAA GGCAUGAAGCAU U	1180
D-1507	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1181	UC[AB]GUAGAAA GGCAUGAAGCAU U	1182
D-1508	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1183	UCU[AB]UAGAAA GGCAUGAAGCAU U	1184
D-1509	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1185	UCUG[AB]AGAAA GGCAUGAAGCAU U	1186
D-1510	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1187	UCUGU[AB]GAAA GGCAUGAAGCAU U	1188
D-1511	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1189	UCUGUA[AB]AAA GGCAUGAAGCAU U	1190
D-1512	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1191	UCUGUAG[AB]AA GGCAUGAAGCAU U	1192
D-1513	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VDT}	1193	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAAU	1194
D-1514	UCAUGCCUUUC	1195	UGCCACUGUAGA	1196

	UACAGUGGC{IN VAB}		AAGGCAUGAUU	
D-1515	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VDA}	1197	UGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1198
D-1516	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUA{IN VDT}	1199	AUAGAAAGGCAU GAAGCAGGAUU	1200
D-1517	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUA{IN VAB}	1201	UUAGAAAGGCAU GAAGCAGGAUU	1202
D-1518	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUA{IN VDA}	1203	UUAGAAAGGCAU GAAGCAGGAUU	1204
D-1519	UAUGUCCUGC UUCAUGCCU{IN VDT}	1205	AAGGCAUGAAGC AGGAACAUAUU	1206
D-1520	UAUGUCCUGC UUCAUGCCU{IN VAB}	1207	UAGGCAUGAAGC AGGAACAUAUU	1208
D-1521	UAUGUCCUGC UUCAUGCCU{IN VDA}	1209	UAGGCAUGAAGC AGGAACAUAUU	1210
D-1522	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUA{IN VAB}	1211	AUAGAAAGGCAU GAAGCAGGAUU	1212
D-1523	UAUGUCCUGC UUCAUGCCU{IN VAB}	1213	AAGGCAUGAAGC AGGAACAUAUU	1214
D-1524	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VDT}	1215	AGCCACUGUAGA AAGGCAUGAUU	1216

D-1525	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUA{IN VDT}	1217	AUAGAAAGGCAU GAAGCAGGAUU	1218
D-1526	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUA{IN VDA}	1219	UUAGAAAGGCAU GAAGCAGGAUU	1220
D-1527	UAUGUCCUGC UUCAUGCCU{IN VDA}	1221	UAGGCAUGAAGC AGGAACAUAUU	1222
D-1528	UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{IN VDA}	1223	UCUGUA[GNA- G]AAAGGCAUGAA GCAUU	1224
D-1529	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1225	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1226
D-1530	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1227	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1228
D-1531	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1229	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1230
D-1532	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1231	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1232
D-1533	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1233	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1234
D-1534	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1235	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1236
D-1535	CUGCUUCAUGC	1237	AUGUAGA[GNA-	1238

	CUUUCUACA{INVAB}		A]AGGCAUGAAGCAGUU	
D-1536	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1239	AUGUAGA[GNA-A]AGGCAUGAAGCAGUU	1240
D-1537	CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1241	AUGUAGA[GNA-A]AGGCAUGAAGCAGUU	1242
D-1538	CUGCUUCAUGC CU[LNA-T]UCUACA{INVAB}	1243	AUGUAGA[GNA-A]AGGCAUGAAGCAGUU	1244
D-1539	CUGCUUCAUGC C[LNA-T]UUCUACA{INVAB}	1245	AUGUAGA[GNA-A]AGGCAUGAAGCAGUU	1246
D-1540	CUGCUUCAUGC CUU[LNA-T]CUACA{INVA B}	1247	AUGUAGA[GNA-A]AGGCAUGAAGCAGUU	1248
D-1541	CUGCUUCAUGC CUUUC[LNA-T]ACA{INVAB}	1249	AUGU[GNA-A]GAAAGGCAUGAAGCAGUU	1250
D-1542	CUGCUUCAUGC CUUUCU[LNA-A]CA{INVAB}	1251	AUG[GNA-U]AGAAAGGCAUGAAGCAGUU	1252
D-1543	CUGCUUCAUGC CUUUCUAC[LNA-A]{INVAB}	1253	A[GNA-U]GUAGAAAGGCAUGAAGCAGUU	1254
D-1544	CUGCUUCAUGC CUU[LNA-T]CUACA{INVA	1255	AUGUAG[AB]AAGGCAUGAAGCAGUU	1256

	B}			
D-1545	CUGCUCUUAUGC CUUUC[LNA- T]ACA{INVAB}	1257	AUGU[AB]GAAAG GCAUGAAGCAGU U	1258
D-1546	CUGCUCUUAUGC CUUUCU[LNA- A]CA{INVAB}	1259	AUG[AB]AGAAAG GCAUGAAGCAGU U	1260
D-1547	CUGCUCUUAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1261	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1262
D-1548	CUGCUCUUAUGC CUUUCUACA{IN VAB}	1263	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1264
D-1549	CUGCUCUUAUGC CU[LNA- T]UCUACA{INV AB}	1265	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1266
D-1550	CUGCUCUUAUGC CU[LNA- T]UCUACA{INV AB}	1267	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1268
D-1551	CUGCUCUUAUGC CU[LNA- T]UCUACA{INV AB}	1269	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1270
D-1552	CUGCUCUUAUGC CU[LNA- T]UCUACA{INV AB}	1271	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGC AGUU	1272
D-1553	UGCUUCAUGCC UUUCU[LNA- A]CAG{INVDA}	1273	UCUG[AB]AGAAA GGCAUGAAGCAU U	1274

D-1554	UGCUUCAUGCC UUUC[LNA- T]ACAG{INVDA}	1275	UCUGU[AB]GAAA GGCAUGAAGCAU U	1276
D-1555	UGCUUCAUGCC UU[LNA- T]CUACAG{INV DA}	1277	UCUGUAG[AB]AA GGCAUGAAGCAU U	1278
D-1556	UGCUUCAUGCC UUUCUAC[LNA- A]G{INVDA}	1279	UC[GNA- U]GUAGAAAGGCA UGAAGCAUU	1280
D-1557	UGCUUCAUGCC UUUCU[LNA- A]CAG{INVDA}	1281	UCUG[GNA- U]AGAAAGGCAUG AAGCAUU	1282
D-1558	UGCUUCAUGCC UUUC[LNA- T]ACAG{INVDA}	1283	UCUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGA AGCAUU	1284
D-1559	UGCUUCAUGCC UUUCUACA[LN A-G]{INVDA}	1285	U[AB]UGUAGAAA GGCAUGAAGCAU U	1286
D-1560	UGCUUCAUGCC UUUCUAC[LNA- A]G{INVDA}	1287	UC[AB]GUAGAAA GGCAUGAAGCAU U	1288
D-1561	UCAUGCCUUUC UACA[LNA- G]UGGC{INVAB }	1289	AGCCA[AB]UGUA GAAAGGCAUGAU U	1290
D-1562	UCAUGCCUUUC UACAG[LNA- T]GGC{INVAB}	1291	AGCCA[AB]UGUA GAAAGGCAUGAU U	1292
D-1563	UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{IN VAB}	1293	AGCCA[AB]UGUA GAAAGGCAUGAU U	1294

D-1564	GGUAUGUCCU GCUUCAUUUU	2257	AAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	2258
D-1565	GGUAUGUCCU GCUUCAUAUU	2259	UAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	2260
D-1566	GUAUGUCCUG CUUCAUGUUU	2261	ACAUGAAGCAGG AACAUACCUU	2262
D-1567	UAUGUCCUGC UUCAUGCAUU	2263	UGCAUGAAGCAG GAACAUAUU	2264
D-1568	AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	2265	AGGCAUGAAGCA GGAACAUAUU	2266
D-1569	UGUCCUGCUU CAUGCCUUUU	2267	AAGGCAUGAAGC AGGAACAUAU	2268
D-1570	GUCCUGCUUC AUGCCUUUUU	2269	AAAGGCAUGAAG CAGGAACUU	2270
D-1571	UCCUGCUUCA UGCCUUUUUU	2271	AAAAGGCAUGAA GCAGGAAUU	2272
D-1572	UCCUGCUUCA UGCCUUUAUU	2273	UAAAGGCAUGAA GCAGGAAUU	2274
D-1573	UCCUGCUUCA GCCUUUCUUU	2275	AGAAAGGCAUGA AGCAGGAUU	2276
D-1574	CCUGCUUCAUG CCUUUCUAUU	2277	UAGAAAGGCAUG AAGCAGGUU	2278
D-1575	CUGCUUCAUGC CUUUCUAUUU	2279	AUAGAAAGGCAU GAAGCAGUU	2280
D-1576	CUGCUUCAUGC CUUUCUAAUU	2281	UUAGAAAGGCAU GAAGCAGUU	2282
D-1577	UGCUUCAUGCC UUUCUACAUU	2283	UGUAGAAAGGCA UGAAGCAUU	2284
D-1578	GCUUCAUGCCU UUCUACAUAUU	2285	AUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	2286

D-1579	GCUUCAUGCCU UUCUACAAUU	2287	UUGUAGAAAGGC AUGAAGCUU	2288
D-1580	CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	2289	ACUGUAGAAAGG CAUGAAGUU	2290
D-1581	UUCAUGCCUUU CUACAGUUUU	2291	AACUGUAGAAAG GCAUGAAUU	2292
D-1582	UUCAUGCCUUU CUACAGUAUU	2293	UACUGUAGAAAG GCAUGAAUU	2294
D-1583	UCAUGCCUUUC UACAGUGUUU	2295	ACACUGUAGAAA GGCAUGAUU	2296
D-1584	UCAUGCCUUUC UACAGUGAUU	2297	UCACUGUAGAAA GGCAUGAUU	2298
D-1585	CAUGCCUUUCU ACAGUGGUUU	2299	ACCACUGUAGAA AGGCAUGUU	2300
D-1586	CAUGCCUUUCU ACAGUGGAUU	2301	UCCACUGUAGAA AGGCAUGUU	2302
D-1587	AUGCCUUUCUA CAGUGGCCUUU	2303	AGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	2304
D-1588	AUGCCUUUCUA CAGUGGCCAUU	2305	UGCCACUGUAGA AAGGCAUUU	2306
D-1589	UGCCUUUCUAC AGUGGCCUUU	2307	AGGCCACUGUAG AAAGGCAUU	2308
D-1590	GCCUUUCUACA GUGGCCUUUU	2309	AAGGCCACUGUA GAAAGGCUU	2310
D-1591	GGUAUGUCCU GCUUCAUCUU	2311	GAUGAAGCAGGA ACAUACCUU	2312
D-1592	GUAUGUCCUG CUUCAUCCUU	2313	GGAUGAAGCAGG AACAUACUU	2314
D-1593	UAUGUCCUGC UUCAUCCUU	2315	GGGAUGAAGCAG GAACAUUU	2316

D-1594	AUGUCCUGCU UCAUCCCCUU	2317	GGGGAUGAAGCA GGAACAUUU	2318
D-1595	UGUCCUGCUU CAUCCCCUUU	2319	AGGGGAUGAAGC AGGAACAUU	2320
D-1596	GUCCUGCUUC AUCCCCUUU	2321	AAGGGGAUGAAG CAGGAACUU	2322
D-1597	UCCUGCUUCA UCCCCUUCUU	2323	GAAGGGGAUGAA GCAGGAAUU	2324
D-1598	UCCUGCUUCAU CCCCUUCUUU	2325	AGAAGGGGAUGA AGCAGGAUU	2326
D-1599	CCUGCUUCAUC CCCUUCUAUU	2327	UAGAAGGGGAUG AAGCAGGUU	2328
D-1600	CUGCUUCAUCC CCUUCUACUU	2329	GUAGAAGGGGAU GAAGCAGUU	2330
D-1601	UGCUUCAUCCC CUUCUACAUU	2331	UGUAGAAGGGGA UGAAGCAUU	2332
D-1602	GCUUCAUCCCC UUCUACAGUU	2333	CUGUAGAAGGGG AUGAAGCUU	2334
D-1603	CUUCAUCCCCU UCUACAGUUU	2335	ACUGUAGAAGGG GAUGAAGUU	2336
D-1604	UUCAUCCCCUU CUACAGUGUU	2337	CACUGUAGAAGG GGAUGAAUU	2338
D-1605	UCAUCCCCUUC UACAGUGGUU	2339	CCACUGUAGAAG GGGAUGAUU	2340
D-1606	CAUCCCCUUCU ACAGUGGCUU	2341	GCCACUGUAGAA GGGGAUGUU	2342
D-1607	AUCCCCUUCUA CAGUGGCCUU	2343	GGCCACUGUAGA AGGGGAUUU	2344
D-1608	UCCCCUUCUAC AGUGGCCUUU	2345	AGGCCACUGUAG AAGGGGAUU	2346

D-1609	CCCCUUCUACA GUGGCCUUUU	2347	AAGGCCACUGUA GAAGGGGUU	2348
D-1610	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2441	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2442
D-1611	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2443	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2444
D-1612	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2445	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2446
D-1613	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2447	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2448
D-1614	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2449	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2450
D-1615	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2451	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2452
D-1616	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2453	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2454
D-1617	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2455	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2456
D-1618	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2457	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2458
D-1619	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2459	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2460
D-1620	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2461	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2462
D-1621	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2463	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2464
D-1622	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2465	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2466
D-1623	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2467	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2468
D-1624	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2469	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2470
D-1625	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2471	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2472

D-1626	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2473	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2474
D-1627	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2475	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2476
D-1628	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2477	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2478
D-1629	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2479	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2480
D-1630	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2481	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2482
D-1631	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2483	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2484
D-1632	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2485	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2486
D-1633	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2487	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2488
D-1634	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2489	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2490
D-1635	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2491	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2492
D-1636	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2493	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2494
D-1637	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2495	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2496
D-1638	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2497	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2498
D-1639	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2499	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2500
D-1640	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2501	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2502
D-1641	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2503	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2504
D-1642	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2505	UAUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2506

D-1643	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2507	UCAGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2508
D-1644	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2509	UCUAUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2510
D-1645	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2511	UCUGAAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2512
D-1646	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2513	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2514
D-1647	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2515	UCUGUAAAAAGGCAUGAA GCAUU	2516
D-1648	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2517	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2518
D-1649	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCT	2519	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2520
D-1650	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2521	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2522
D-1651	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2523	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2524
D-1652	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUAT	2525	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	2526
D-1653	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUAA	2527	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	2528
D-1654	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUAA	2529	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	2530
D-1655	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUT	2531	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2532
D-1656	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2533	UAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2534
D-1657	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2535	UAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2536
D-1658	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUAA	2537	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	2538
D-1659	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2539	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2540

D-1660	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2541	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2542
D-1661	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCT	2543	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2544
D-1662	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUAT	2545	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	2546
D-1663	UCCUGCUUCAU GCCUUUCUAA	2547	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	2548
D-1664	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2549	UAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2550
D-1665	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2551	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2552
D-1666	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2553	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2554
D-1667	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2555	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2556
D-1668	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2557	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2558
D-1669	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2559	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2560
D-1670	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2561	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2562
D-1671	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2563	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2564
D-1672	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2565	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2566
D-1673	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2567	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2568
D-1674	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2569	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2570
D-1675	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2571	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2572
D-1676	CUGCUUCAUGC CTUUCUACAA	2573	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2574

D-1677	CUGCUUCAUGC CUUTCUACAA	2575	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2576
D-1678	CUGCUUCAUGC CUUUCTACAA	2577	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2578
D-1679	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2579	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2580
D-1680	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2581	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2582
D-1681	CUGCUUCAUGC CUUTCUACAA	2583	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2584
D-1682	CUGCUUCAUGC CUUUCTACAA	2585	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2586
D-1683	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2587	AUGAAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2588
D-1684	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2589	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2590
D-1685	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2591	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2592
D-1686	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2593	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2594
D-1687	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2595	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2596
D-1688	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2597	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2598
D-1689	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2599	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2600
D-1690	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2601	UCUGAAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2602
D-1691	UGCUUCAUGCC UUUCTACAGA	2603	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2604
D-1692	UGCUUCAUGCC UUTCUCACAGA	2605	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2606
D-1693	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2607	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2608

D-1694	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2609	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2610
D-1695	UGCUUCAUGCC UUUCTACAGA	2611	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2612
D-1696	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2613	UAUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2614
D-1697	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2615	UCAGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2616
D-1698	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2617	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2618
D-1699	UCAUGCCUUUC UACAGTGGCA	2619	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2620
D-1700	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2621	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2622
D-1701	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2623	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2624
D-1702	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2625	AUAUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2626
D-1703	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2627	UCUAUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2628
D-1704	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2629	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2630
D-1705	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2631	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2632
D-1706	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2633	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2634
D-1707	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2635	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2636
D-1708	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2637	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2638
D-1709	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2639	A[MEO- I]GUAGAAAGGCAUGAAGC AGUU	2640
D-1710	CUGCUUCAUGC	2641	AUG[MEO-	2642

	CUUUCUACAA		I]AGAAAGGCAUGAAGCAG UU	
D-1711	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2643	AUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	2644
D-1712	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2645	AUGUA[MEO- I]AAAGGCAUGAAGCAGUU	2646
D-1713	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2647	AUGUAGA[MEO- I]AGGCAUGAAGCAGUU	2648
D-1714	CUGCUUCAUGC CUUUCUACCA	2649	A[MEO- I]GUAGAAAGGCAUGAAGC AGUU	2650
D-1715	CUGCUUCAUGC CUUUCUCCAA	2651	AUG[MEO- I]AGAAAGGCAUGAAGCAG UU	2652
D-1716	CUGCUUCAUGC CUUCCUACAA	2653	AUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAGUU	2654
D-1717	CUGCUUCAUGC CUCUCUACAA	2655	AUGUAGA[MEO- I]AGGCAUGAAGCAGUU	2656
D-1718	CUGCUUCAUGC CUUUCUACUA	2657	AAGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2658
D-1719	CUGCUUCAUGC CUUUCUUCAA	2659	AUGAAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2660
D-1720	CUGCUUCAUGC CUUUCAACAA	2661	AUGUUGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2662
D-1721	CUGCUUCAUGC CUAUCUACAA	2663	AUGUAGAUAGGCAUGAAG CAGUU	2664
D-1722	UGCUUCAUGCC UUUCUACACA	2665	A[MEO- I]UGUAGAAAGGCAUGAAG CAUU	2666
D-1723	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2667	AC[MEO- I]GUAGAAAGGCAUGAAGC AUU	2668
D-1724	UGCUUCAUGCC	2669	ACUG[MEO-	2670

	UUUCUACAGA		I]AGAAAGGCAUGAAGCAU U	
D-1725	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2671	ACUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAUU	2672
D-1726	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2673	ACUGUA[MEO- I]AAAGGCAUGAAGCAUU	2674
D-1727	UGCUUCAUGCC UUUCUACCGA	2675	AC[MEO- I]GUAGAAAGGCAUGAAGC AUU	2676
D-1728	UGCUUCAUGCC UUUCUCCAGA	2677	ACUG[MEO- I]AGAAAGGCAUGAAGCAU U	2678
D-1729	UGCUUCAUGCC UUUCCACAGA	2679	ACUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAUU	2680
D-1730	CUGCUUCAUGC CUUUCUAAAA	2681	AUUUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2682
D-1731	CUGCUUCAUGC CUUUAUACAA	2683	AUGUAUAAAGGCAUGAAG CAGUU	2684
D-1732	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2685	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2686
D-1733	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2687	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2688
D-1734	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2689	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2690
D-1735	UGCUUCAUGCC UUTCUACAGA	2691	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2692
D-1736	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2693	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2694
D-1737	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2695	AUGUAAAAAGGCAUGAAG CAGUU	2696
D-1738	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2697	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2698
D-1739	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2699	AU[MEO- I]UAGAAAGGCAUGAAGCA	2700

			GUU	
D-1740	CUGCUUCAUGC CUUUCUAGAA	2701	AUCUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2702
D-1741	CUGCUUCAUGC CUUACUACAA	2703	AUGUAGUAAGGCAUGAAG CAGUU	2704
D-1742	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2705	ACU[MEO- IJUAGAAAGGCAUGAAGCA UU	2706
D-1743	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2707	ACUGUAG[MEO- IJAAGGCAUGAAGCAUU	2708
D-1744	UGCUUCAUGCC UCCUACAGA	2709	ACUGUAG[MEO- IJAAGGCAUGAAGCAUU	2710
D-1745	CUGCUUCAUGC CUUUCUAUAA	2711	AUAUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2712
D-1746	CUGCUUCAUGC CUUUUACAA	2713	AUGUAAAAAGGCAUGAAG CAGUU	2714
D-1747	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2715	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2716
D-1748	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2717	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2718
D-1749	CUGCUUCAUGC CUUTCUACAA	2719	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2720
D-1750	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2721	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2722
D-1751	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2723	AAGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2724
D-1752	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2725	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2726
D-1753	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2727	UCUGUAAAAAGGCAUGAA GCAUU	2728
D-1754	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2729	AUGUAG[MEO- IJAAGGCAUGAAGCAGUU	2730
D-1755	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2731	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2732

D-1756	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2733	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2734
D-1757	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2735	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2736
D-1758	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2737	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2738
D-1759	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2739	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2740
D-1760	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2741	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2742
D-1761	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2743	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2744
D-1762	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2745	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2746
D-1763	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2747	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2748
D-1764	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2749	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2750
D-1765	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2751	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2752
D-1766	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2753	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2754
D-1767	CUGCUUCAUGG GAUUCUACAA	2755	AUGUAGAAUCCCAUGAAG CAGUU	2756
D-1768	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2757	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2758
D-1769	GUAUGUCCUG CUUCAUGCCA	2759	AGGCAUGAAGCAGGAACA UACUU	2760
D-1770	UGUCCUGCUUC AUGCCUUUCA	2761	AGAAAGGCAUGAAGCAGG ACAUU	2762
D-1771	GCUUCAUGCCU UUCUACAGUA	2763	AACUGUAGAAAGGCAUGA AGCUU	2764
D-1772	CUUCAUGCCUU UCUACAGUGA	2765	ACACUGUAGAAAGGCAUG AAGUU	2766

D-1773	UUCAUGCCUUU CUACAGUGGA	2767	ACCACUGUAGAAAGGCAU GAAUU	2768
D-1774	CUGCUUCAUGC CUUUCAACAA	2769	AUGUUGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2770
D-1775	CUGCUUCAUGC CUUUCUCCAA	2771	AUG[MEO- I]AGAAAGGCAUGAAGCAG UU	2772
D-1776	UGCUUCAUGCC UUUCUCCAGA	2773	ACUG[MEO- I]AGAAAGGCAUGAAGCAU U	2774
D-1777	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2775	AUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	2776
D-1778	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2777	ACUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAUU	2778
D-1779	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2779	AUGUA[MEO- I]AAAGGCAUGAAGCAGUU	2780
D-1780	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2781	ACUGUA[MEO- I]AAAGGCAUGAAGCAUU	2782
D-1781	CUGCUUCAUGC CUUCCUACAA	2783	AUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAGUU	2784
D-1782	CUGCUUCAUGC CUCUCUACAA	2785	AUGUAGA[MEO- I]AGGCAUGAAGCAGUU	2786
D-1783	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2787	UCUGAAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2788
D-1784	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2789	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2790
D-1785	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2791	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2792
D-1786	CUGCUUCAUGC CUUUCTACAA	2793	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2794
D-1787	CUGCUUCAUGC CUUUCTACAA	2795	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2796
D-1788	UGCUUCAUGCC	2797	UCUGUAGAAAGGCAUGAA	2798

	UUUCTACAGA		GCAUU	
D-1789	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2799	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2800
D-1790	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2801	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2802
D-1791	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2803	AU[MEO- I]UAGAAAGGCAUGAAGCA GUU	2804
D-1792	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2805	AUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAGUU	2806
D-1793	CUGCUUCAUGC CUUACUACAA	2807	AUGUAGUAAAGGCAUGAAG CAGUU	2808
D-1794	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2809	ACUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAUU	2810
D-1795	UGCUUCAUGCC UUCCUACAGA	2811	ACUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAUU	2812
D-1796	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2813	ACU[MEO- I]UAGAAAGGCAUGAAGCA UU	2814
D-1797	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2815	AUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	2816
D-1798	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2817	AUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	2818
D-1799	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2819	AUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	2820
D-1800	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2821	AUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAGUU	2822
D-1801	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2823	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2824
D-1802	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2825	AGCCAAUGUAGAAAGGCA UGAUU	2826

D-1803	CUGCUUCAUGG GAUUGUACAA	2827	AUGUACAAUCCCAUGAAG CAGUU	2828
D-1804	CUGCUUCAUGC CUUUCTACAA	2829	AUGU[MEO- I]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	2830
D-1805	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2831	ACUGUA[MEO- I]AAAGGCAUGAAGCAUU	2832
D-1806	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2833	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2834
D-1807	CUGCUUCAUGC CUTUCUACAA	2835	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2836
D-1808	CUGCUUCAUGC CUUTCUACAA	2837	AUGUAG[MEO- I]AAGGCAUGAAGCAGUU	2838
D-1809	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2839	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2840
D-1810	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2841	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2842
D-1811	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2843	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2844
D-1812	UGUCCUGCUU CAUGCCUUUA	2845	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	2846
D-1813	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2847	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2848
D-1814	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2849	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2850
D-1815	UGUCCUGCUU CAUGCCUA	2851	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	2852
D-1816	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2853	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2854
D-1817	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2855	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUACC	2856
D-1818	UAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2857	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUACC	2858
D-1819	UAUGUCCUGC	2859	AAGGCAUGAAGCAGGAAC	2860

	UUCAUGCCUA		AUAUU	
D-1820	UAUGUCCUGC UUCAUGCGUA	2861	AACGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2862
D-1821	UAUGUCCUGC UUCAUGGCCUA	2863	AAGCCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	2864
D-1822	UAUGUCCUGC UUCAAGCCUA	2865	AAGGCUUGAAGCAGGAAC AUAUU	2866
D-1823	UAUGUCCUGC UUCUUGCCUA	2867	AAGGCAAGAAGCAGGAAC AUAUU	2868
D-1824	UAUGUCCUGC UUGAUGCCUA	2869	AAGGCAUCAAGCAGGAAC AUAUU	2870
D-1825	UAUGUCCUGC UACAUGCCUA	2871	AAGGCAUGUAGCAGGAAC AUAUU	2872
D-1826	UAUGUCCUGC AUCAUGCCUA	2873	AAGGCAUGAUGCAGGAAC AUAUU	2874
D-1827	UAUGUCCUGG UUCAUGCCUA	2875	AAGGCAUGAACCAGGAAC AUAUU	2876
D-1828	UAUGUCCUCC UUCAUGCCUA	2877	AAGGCAUGAAGGAGGAAC AUAUU	2878
D-1829	UAUGUCCAGC UUCAUGCCUA	2879	AAGGCAUGAAGCUGGAAC AUAUU	2880
D-1830	UAUGUUCGUGC UUCAUGCCUA	2881	AAGGCAUGAAGCACGAAC AUAUU	2882
D-1831	UAUGUUGCUGC UUCAUGCCUA	2883	AAGGCAUGAAGCAGCAAC AUAUU	2884
D-1832	UAUGUACCUGC UUCAUGCCUA	2885	AAGGCAUGAAGCAGGUAC AUAUU	2886
D-1833	UAUGAUCCUGC UUCAUGCCUA	2887	AAGGCAUGAAGCAGGAUC AUAUU	2888
D-1834	UAUCUCCUGC UUCAUGCCUA	2889	AAGGCAUGAAGCAGGAAG AUAUU	2890
D-1835	UAAGUCCUGC UUCAUGCCUA	2891	AAGGCAUGAAGCAGGAAC UUAUU	2892
D-1836	UUUGUCCUGC	2893	AAGGCAUGAAGCAGGAAC	2894

	UUCAUGCCUA		AAAUU	
D-1837	AAUGUCCUGC UUCAUGCCUA	2895	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUUUU	2896
D-1838	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2897	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2898
D-1839	UCAUGCCUUUC UACAGUGGGA	2899	ACCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2900
D-1840	UCAUGCCUUUC UACAGUGCCA	2901	AGGCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2902
D-1841	UCAUGCCUUUC UACAGUCGCA	2903	AGCGACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2904
D-1842	UCAUGCCUUUC UACAGAGGCA	2905	AGCCUCUGUAGAAAGGCA UGAUU	2906
D-1843	UCAUGCCUUUC UACACUGGCA	2907	AGCCAGUGUAGAAAGGCA UGAUU	2908
D-1844	UCAUGCCUUUC UACUGUGGCA	2909	AGCCACAGUAGAAAGGCA UGAUU	2910
D-1845	UCAUGCCUUUC UAGAGUGGCA	2911	AGCCACUCUAGAAAGGCA UGAUU	2912
D-1846	UCAUGCCUUUC UUCAGUGGCA	2913	AGCCACUGAAGAAAGGCA UGAUU	2914
D-1847	UCAUGCCUUUC AACAGUGGCA	2915	AGCCACUGUUGAAAGGCA UGAUU	2916
D-1848	UCAUGCCUUUG UACAGUGGCA	2917	AGCCACUGUACAAAGGCA UGAUU	2918
D-1849	UCAUGCCUAUC UACAGUGGCA	2919	AGCCACUGUAGAUAGGCA UGAUU	2920
D-1850	UCAUGCGUUUC UACAGUGGCA	2921	AGCCACUGUAGAAACGCA UGAUU	2922
D-1851	UCAUGGCUUUC UACAGUGGCA	2923	AGCCACUGUAGAAAGCCA UGAUU	2924
D-1852	UCAAGCCUUUC UACAGUGGCA	2925	AGCCACUGUAGAAAGGCU UGAUU	2926
D-1853	UCUUGCCUUUC	2927	AGCCACUGUAGAAAGGCA	2928

	UACAGUGGCA		AGAUU	
D-1854	UGAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2929	AGCCACUGUAGAAAGGCA UCAUU	2930
D-1855	ACAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2931	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGUUU	2932
D-1856	UCAUGCCUUAC UACAGUGGCA	2933	AGCCACUGUAGUAAGGCA UGAUU	2934
D-1857	AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUA	2935	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	2936
D-1858	AUGCCUUUCUA CAGUGGCA	2937	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	2938
D-1859	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2939	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2940
D-1860	AAUGCCUUUCU ACAGUGGCU	2941	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	2942
D-1861	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCUA	2943	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2944
D-1862	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2945	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAAG	2946
D-1863	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCUA	2947	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAAG	2948
D-1864	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCUA	2949	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2950
D-1865	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2951	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAAG	2952
D-1866	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCUA	2953	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAAG	2954
D-1867	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2955	AUGUA[MEO- I]AAAGGCAUGAAGCAGUU	2956
D-1868	GCGGCUUCGAC GGCUUCUAUU	2957	UAGAAGCCGUCGAAGCCG CUU	2958
D-1869	GCGGCUUCGAC GGGUUCUAUU	2959	UAGAACCCGUCGAAGCCG CUU	2960
D-1870	GCGGCUUCGAC	2961	UAGAAGGCGUCGAAGCCG	2962

	GCCUUCUAUU		CUU	
D-1871	GCGGCUUCGAC CGCUUCUAUU	2963	UAGAAGCGGUCGAAGCCG CUU	2964
D-1872	GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	2965	AUAGAAGCCCAGGAAGCC GCUU	2966
D-1873	AGCUUCAUGGG AUUGUACAUUU	2967	AUGUACAAUCCCAUGAAG CUU	2968
D-1874	UCAUGCCUUUG AUCACUGGCA	2969	AGCCAGUGAUCAAAGGCA UGAUU	2970
D-1875	GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	2971	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	2972
D-1876	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2973	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2974
D-1877	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2975	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2976
D-1878	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2977	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2978
D-1879	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2979	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2980
D-1880	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2981	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2982
D-1881	UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	2983	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	2984
D-1882	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAA	2985	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2986
D-1883	UGCUUCAUGCC UUUCUACAGA	2987	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	2988
D-1884	CUGCUUCAUGC CUUUCUACAT	2989	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	2990

Чтобы повысить активность и стабильность *in vivo* последовательностей siRNA PNPLA3, встраивали химические модификации в молекулы siRNA PNPLA3. В частности, встраивали 2'-О-метил- и 2'-фтор-модификации рибозного сахара в определенные положения siRNA PNPLA3. Также встраивали фосфоротиоатные межнуклеотидные связи в концевые участки антисмысловых и/или смысловых последовательностей. В нижеприведенной таблице 2 изображены модификации в смысловой и антисмысловых последовательностях для каждой из модифицированных siRNA PNPLA3. Нуклеотидные последовательности в таблице 2 и других частях заявки перечислены в соответствии со следующими обозначениями: A, U, G и C = соответствующий рибонуклеотид; dT = дезокситимидин; dA = дезоксиаденозин; dC = дезоксицитидин; dG = дезоксигуанозин; invdT = инвертированный дезокситимидин; invdA = инвертированный дезоксиаденозин; invdC = инвертированный дезоксицитидин; invdG = инвертированный дезоксигуанозин; a, u, g и c = соответствующий 2'-О-метилрибонуклеотид; Af, Uf, Gf и Cf = соответствующий 2'-дезокси-2'-фтор("2'-фтор")рибонуклеотид; Ab = нуклеотид с удаленным азотистым основанием; MeO-I = 2'-метоксиинозин; GNA = гликолевая нуклеиновая кислота; sGNA = гликолевая нуклеиновая кислота с 3'-фосфоротиоатом; LNA = закрытая нуклеиновая кислота. Вставка "s" в последовательность означает, что два соседних нуклеотида связаны фосфоротиодиэфирной группой (например, фосфоротиоатной межнуклеотидной связью). Если не указано иное, все другие нуклеотиды связаны 3'-5'-фосфодиэфирными группами. Каждое из соединений на основе siRNA в табл. 2 содержит дуплексный участок длиной в 19 пар оснований, содержащий либо липкий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце обеих нитей, либо тупой конец на одном или на обоих концах. GalNAc3K2AhxС6 представляет собой:

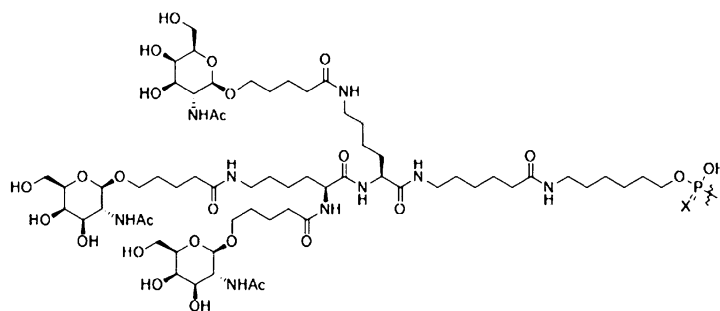


Таблица 2

Последовательности siRNA, направленные на PNPLA3 с модификациями

Дупле кс №	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (смы слова я)	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (антис мысло вая)
D- 2000	GfsgsGfcAfaUfaAfAfGfuAfcC fuGfcUfsusUf	167	asGfscAfgGfuAfcuuUfaUfuGfc CfcsUfsu	168
D- 2001	CfsgsGfcCfaAfaGfUfCfcAfcC faGfcUfsusUf	169	asGfscUfgGfuGfgacAfuUfgGfc CfcsUfsu	170
D- 2002	GfsgsUfcCfaGfcCfUfGfaAfcU fuCfuUfsusUf	171	asAfsGfaGfuUfcagGfcUfgGfa CfcsUfsu	172
D- 2003	GfscsUfuCfaUfcCfCfCfuUfcU faCfaGfsusUf	173	csUfsgUfaGfaAfgggGfaUfgAfa GfcsUfsu	174
D- 2004	GfscsGfgCfuUfcCfUfGfgGfcU fuCfuAfsusUf	175	usAfsGfaGfcCfcagGfaAfgCfc GfcsUfsu	176
D- 2005	GfscsCfuCfuGfaGfCfUfgAfgU fuGfgUfsusUf	177	asCfscAfaCfuCfagcUfcAfgAfg GfcsUfsu	178
D- 2006	GfsusGfaCfaAfcGfUfAfcCfcU fuCfaUfsusUf	179	asUfsgAfaGfgGfuacGfuUfgUfc AfcUfsu	180
D- 2007	CfscsCfcCfcUfcCfAfGfgUfcCf cAfaAfsusUf	181	usUfsuGfgGfaCfcugGfaGfgCfc GfcsUfsu	182
D- 2008	CfsusUfcAfuCfcCfCfUfuCfuA fcAfgUfsusUf	183	asCfsuGfuAfgAfgGfgAfuGfa AfgsUfsu	184
D- 2009	GfsgsUfaUfgUfuCfCfUfgCfuU fcAfuGfsusUf	185	csAfsuGfaAfgCfaggAfaCfaUfa CfcsUfsu	186
D- 2010	GfsusAfuGfuUfcCfUfGfcUfuC faUfgCfsusUf	187	gsCfsaUfgAfaGfcagGfaAfcAfu AfcUfsu	188
D- 2011	UfsasUfgUfuCfcUfGfCfuUfcA fuGfcCfsusUf	189	gsGfscAfuGfaAfgcaGfgAfaCfa UfasUfsu	190
D- 2012	AfsusGfuUfcCfuGfCfUfuCfaU fgCfcCfsusUf	191	gsGfsgCfaUfgAfgcAfgGfaAfc AfuUfsu	192
D- 2013	UfsgsUfuCfcUfgCfUfUfcAfuG fcCfcUfsusUf	193	asGfsgGfcAfuGfaagCfaGfgAfa CfasUfsu	194
D- 2014	GfsusUfcCfuGfcUfUfCfaUfgC fcCfuUfsusUf	195	asAfsGfgCfaUfgaaGfcAfgGfa AfcUfsu	196
D- 2015	UfsusCfcUfgCfuUfCfAfuGfcC fcUfuCfsusUf	197	gsAfsaGfgGfcAfuGfaAfgCfaGfg AfasUfsu	198
D- 2016	UfscsCfuGfcUfuCfAfUfgCfcC fuUfcUfsusUf	199	asGfsaAfgGfgCfaugAfaGfcAfg GfasUfsu	200

D-2017	CfsesUfgCfuUfcAfUfGfcCfcUfuCfuAfsusUf	201	usAfsGfaGfgGfcGfaUfgCfaGfGsu	202
D-2018	CfsusGfcUfuCfaUfGfCfcCfuUfcUfaCfsusUf	203	gsUfsaGfaAfgGfgcaUfgAfaGfcAfgUfsu	204
D-2019	UfsgsCfuUfcAfuGfCfCfcUfuCfuAfcAfsusUf	205	usGfsuAfgAfaGfggcAfuGfaAfgCfasUfsu	206
D-2020	GfscsUfuCfaUfgCfCfCfuUfcUfaCfaGfsusUf	207	csUfsgUfaGfaAfgggCfaUfgAfaGfcsUfsu	208
D-2021	CfsusUfcAfuGfcCfCfUfuCfuAfcAfgUfsusUf	209	asCfsuGfuAfgAfggGfcAfuGfaAfgUfsu	210
D-2022	UfsusCfaUfgCfcCfUfuUfaCfaGfuGfsusUf	211	csAfsCufGfaGfaagGfgCfaUfgAfasUfsu	212
D-2023	UfscsAfuGfcCfcUfUfCfuAfcAfgUfgGfsusUf	213	csCfsaCfuGfuAfgaaGfgGfcAfuGfasUfsu	214
D-2024	CfsasUfgCfcCfuUfCfUfaCfaGfuGfCfsusUf	215	gsCfscAfcUfgUfagaAfgGfgCfaUfgUfsu	216
D-2025	AfsusGfcCfcUfuCfUfAfcAfgUfgGfcCfsusUf	217	gsGfscCfaCfuGfuagAfaGfgGfcAfusUfsu	218
D-2026	UfsgsCfcCfuUfcUfAfcAfaGfuGfgCfcUfsusUf	219	asGfsgCfcAfcUfguaGfaAfgGfgCfasUfsu	220
D-2027	GfscsCfcUfuCfuAfcAfgUfgGfcCfuUfsusUf	221	asAfsGfcCfaCfuguAfgAfaGfgGfcsUfsu	222
D-2028	GfsgsUfaUfgUfuCfCfUfgCfuUfcAfuCfsusUf	223	gsAfsuGfaAfgCfaggAfaCfaUfaCfcsUfsu	224
D-2029	GfsusAfuGfuUfcCfUfGfcUfuCfaUfcCfsusUf	225	gsGfsaUfgAfaGfcagGfaAfcAfuAfcUfsu	226
D-2030	UfsasUfgUfuCfcUfGfCfuUfcAfuCfcCfsusUf	227	gsGfsgAfuGfaAfgcaGfgAfaCfaUfasUfsu	228
D-2031	AfsusGfuUfcCfuGfCfUfuCfaUfcCfcCfsusUf	229	gsGfsgGfaUfgAfgcAfgGfaAfcAfusUfsu	230
D-2032	UfsgsUfuCfcUfgCfUfUfcAfuCfcCfcUfsusUf	231	asGfsgGfgAfuGfaagCfaGfgAfaCfasUfsu	232
D-2033	GfsusUfcCfuGfcUfUfCfaUfcCfcCfuUfsusUf	233	asAfsGfgGfaUfgaaGfcAfgGfaAfcUfsu	234

D-2034	UfsusCfcUfgCfuUfCfAfuCfcCfcUfuCfsusUf	235	gsAfsaGfgGfgAfugaAfgCfaGfgAfasUfsu	236
D-2035	UfscsCfuGfcUfuCfAfUfcCfcCfuUfcUfsusUf	237	asGfsaAfgGfgGfaugAfaGfcAfgGfasUfsu	238
D-2036	CfscsUfgCfuUfcAfUfCfcCfcUfuCfuAfsusUf	239	usAfsGfaGfgGfgauGfaAfgCfaGfgsUfsu	240
D-2037	CfsusGfcUfuCfaUfCfCfcCfuUfcUfaCfsusUf	241	gsUfsaGfaAfgGfggaUfgAfaGfcAfgsUfsu	242
D-2038	UfsgsCfuUfcAfuCfCfcCfcUfuCfuAfcAfsusUf	243	usGfsuAfgAfaGfgggAfuGfaAfgCfasUfsu	244
D-2039	UfsusCfaUfcCfcCfuUfUfcUfaCfaGfuGfsusUf	245	csAfsCufgUfaGfaagGfgGfaUfgAfasUfsu	246
D-2040	UfscsAfuCfcCfcUfUfCfuAfaCfaUfgUfgGfsusUf	247	csCfsaCfuGfuAfgaaGfgGfgAfuGfasUfsu	248
D-2041	CfsasUfcCfcCfuUfCfUfaCfaGfuGfgCfsusUf	249	gsCfscAfcUfgUfagaAfgGfgGfaUfgsUfsu	250
D-2042	UfscsCfcCfuUfcUfAfcCfaGfuGfgCfcUfsusUf	251	asGfsgCfcAfcUfguaGfaAfgGfgGfasUfsu	252
D-2043	GfsasUfcAfgGfaCfCfcGfaGfcUfcGfaUfsusUf	253	asUfscGfgCfuCfgggUfcCfuGfaUfcsUfsu	254
D-2044	UfsgsGfgCfuUfcUfAfcCfcAfcGfuCfgUfsusUf	255	asCfsgAfcGfuGfguaGfaAfgCfcCfasUfsu	256
D-2045	GfsasGfcGfaGfcAfCfGfcCfcCfcCfaUfsusUf	257	asUfsgCfgGfgGfcguGfcUfcGfcUfcsUfsu	258
D-2046	UfsgsCfaCfuGfcGfUfCfGfgGfcGfuCfcUfsusUf	259	asGfsgAfcGfcCfGacGfcAfgUfgCfasUfsu	260
D-2047	UfsgsGfaGfcAfgAfcUfcUfgCfaGfgUfsusUf	261	asCfscUfgCfaGfaguCfuGfcUfcCfasUfsu	262
D-2048	UfsgsCfaGfgUfcCfUfCfuCfaGfaUfcUfsusUf	263	asGfsaUfcUfgAfgagGfaCfcUfgCfasUfsu	264
D-2049	CfscsCfGfcCfaAfUfGfuCfcAfcCfaUfsusUf	265	asUfsgGfuGfgAfcuUfgGfcCfGfgsUfsu	266
D-2050	UfsusCfuAfcAfgUfGfGfcCfuUfaUfcUfsusUf	267	asGfsaUfaAfgGfccaCfuGfuAfgAfasUfsu	268

D-2051	UfscsUfaCfaGfuGfGfCfcUfuAfuCfcUfsusUf	269	asGfsgAfuAfaGfgccAfcUfgUfaGfasUfsu	270
D-2052	CfsusUfcCfuUfcAfGfAfgGfcGfuGfcUfsusUf	271	asGfscAfcGfcCfucuGfaAfgGfaAfgsUfsu	272
D-2053	UfsusCfcUfuCfaGfAfGfgCfgUfgCfgAfsusUf	273	usCfsgCfaCfgCfcucUfgAfaGfgAfasUfsu	274
D-2054	GfscsGfuGfcGfaUfAfUfgUfgGfaUfgUfsusUf	275	asCfsaUfcCfaCfaUfcGfcAfcGfcsUfsu	276
D-2055	CfsgsUfgCfgAfuAfUfGfuGfgAfuGfgAfsusUf	277	usCfscAfuCfcAfcuAfuCfGcCfaCfsgsUfsu	278
D-2056	UfsgsGfaUfgGfaGfGfAfgUfgAfgUfgAfsusUf	279	usCfsaCfuCfaCfuccUfcCfaUfcCfasUfsu	280
D-2057	AfscsGfuAfcCfcUfUfCfaUfuGfaUfgUfsusUf	281	asCfsaUfcAfaUfgaaGfgGfuAfcGfusUfsu	282
D-2058	UfsgsGfaCfaUfcAfcCfaAfgCfuCfaUfsusUf	283	asUfsgAfgCfuUfgguGfaUfgUfcCfasUfsu	284
D-2059	CfsasCfcUfgCfgUfCfUfcAfgCfaUfcUfsusUf	285	asGfsaUfgCfuGfagaCfGcCfaGfgUfsgsUfsu	286
D-2060	AfscsCfuGfcGfuCfUfCfaGfcAfuCfcUfsusUf	287	asGfsgAfuGfcUfgagAfcGfcAfgGfusUfsu	288
D-2061	CfscsAfgAfgAfcUfGfGfuGfaCfaUfgUfsusUf	289	asCfsaUfgUfcAfccaGfuCfuCfuGfsgsUfsu	290
D-2062	AfsusGfgCfuUfcCfAfGfaUfaUfgCfcUfsusUf	291	asGfsgCfaUfaUfcugGfaAfgCfcAfusUfsu	292
D-2063	CfscsGfcCfuCfcAfGfGfuCfcCfaAfaUfsusUf	293	asUfsuUfgGfgAfcuGfgAfgGfcGfsgsUfsu	294
D-2064	UfsasCfcUfgCfuGfGfUfgCfuGfaGfgUfsusUf	295	asCfscUfcAfgCfaccAfgCfaGfgUfasUfsu	296
D-2065	AfscsCfuGfcUfgGfUfGfcUfgAfgGfgUfsusUf	297	asCfscCfuCfaGfcaCfaGfcAfgGfusUfsu	298
D-2066	CfsusCfuCfcAfcCfUfUfuCfcCfaGfuUfsusUf	299	asAfscUfgGfgAfaagGfuGfgAfgAfgsUfsu	300
D-2067	UfsusUfuUfcAfcCfUfAfaCfuAfaAfaUfsusUf	301	asUfsuUfuAfgUfuagGfuGfaAfaAfasUfsu	302

D-2068	CfgGfcCfaAfuGfUfCfcAfcCfa GfcUfsusUf	303	asGfscUfgGfuGfgacAfuUfgGfc CfcsUfsu	304
D-2069	GfgUfcCfaGfcCfUfGfaAfcUfu CfuUfsusUf	305	asAfsGfaGfuUfcagGfcUfgGfa CfcsUfsu	306
D-2070	GfcGfgCfuUfcCfUfGfgGfcUfu CfuAfsusUf	307	usAfsGfaGfcCfcagGfaAfgCfc GfcsUfsu	308
D-2071	GfuGfaCfaAfcGfUfAfcCfcUfu CfaUfsusUf	309	asUfsgAfaGfgGfuacGfuUfgUfc AfcUfsu	310
D-2072	GfgUfaUfgUfuCfCfUfgCfuUfc AfuGfsusUf	311	csAfsuGfaAfgCfaggAfaCfaUfa CfcsUfsu	312
D-2073	GfuAfuGfuUfcCfUfGfcUfuCfa UfgCfsusUf	313	gsCfsaUfgAfaGfcagGfaAfcAfu AfcUfsu	314
D-2074	UfgUfuCfcUfgCfUfUfcAfuGfc CfcUfsusUf	315	asGfsgGfcAfuGfaagCfaGfgAfa CfasUfsu	316
D-2075	GfuUfcCfuGfcUfUfCfaUfgCfc CfuUfsusUf	317	asAfsGfgCfaUfgaaGfcAfgGfa AfcUfsu	318
D-2076	CfcUfgCfuUfcAfuGfcCfcUfu CfuAfsusUf	319	usAfsGfaGfgGfcuGfaAfgCfa GfcsUfsu	320
D-2077	GfcUfuCfaUfgCfCfUfuUfa CfaGfsusUf	321	csUfsgUfaGfaAfgggCfaUfgAfa GfcsUfsu	322
D-2078	CfuUfcAfuGfcCfCfUfuCfuAfc AfgUfsusUf	323	asCfsuGfuAfgAfgGfcAfuGfa AfgUfsu	324
D-2079	UfuCfaUfgCfcCfUfUfaCfa GfuGfsusUf	325	csAfsUfgUfaGfaagGfgCfaUfg AfasUfsu	326
D-2080	AfuGfgCfuUfcCfAfgfaUfaUfg CfcUfsusUf	327	asGfsgCfaUfaUfcugGfaAfgCfc AfusUfsu	328
D-2081	AfuGfcCfcUfuCfUfAfcAfgUfg GfcCfsusUf	329	gsGfscCfaCfuGfuagAfaGfgGfc AfusUfsu	330
D-2082	GfcUfuCfaUfgCfCfUfuUfa CfaUfsusUf	331	asUfsgUfaGfaAfgggCfaUfgAfa GfcsUfsu	332
D-2083	{Фочар}GfsgsAfaAfgAfcUf GfUfuCfcAfaAfaAfsusUf	1295	{Фочар}usUfsUfuGfgAfaca GfuCfuUfuCfcsUfsu	1296
D-2084	{GalNAc3K2AhxC6}ggsuaug UfuCfCfUfGfcuucagsusu	1297	{Фочар}csAfsuGfaAfgfcagg AfaCfauaccusu	1298

D-2085	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugsusu	1299	{Фочфат}gsCfsaUfgAfAfgcagGfaAfcuacsusu	1300
D-2086	{GalNAc3K2AhxC6}uguuccUfgCfUfUfCfaugcccsusu	1301	{Фочфат}asGfsgGfcAfUfgaagCfaGfgaacasusu	1302
D-2087	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUfgCfCfCfUfucuacagsusu	1303	{Фочфат}csUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagsusu	1304
D-2088	{GalNAc3K2AhxC6}cuucauGfcCfCfUfUfucuacagsusu	1305	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaaggGfcAfugaagsusu	1306
D-2089	{GalNAc3K2AhxC6}gcggcuUfcCfUfGfGfgcuucasusu	1307	{Фочфат}usAfsGfAfaGfCfccagGfaAfgccgsusu	1308
D-2090	{GalNAc3K2AhxC6}guuccuGfcUfUfCfAfugccuususu	1309	{Фочфат}asAfsGfGfCfAfugaaGfcAfggaacsusu	1310
D-2091	{GalNAc3K2AhxC6}AfuGfgCfuUfcCfAfGfaUfaUfgCfcUfsusUf	1311	{Фочфат}asGfsgCfaUfaUfcugGfaAfgCfcAfusUfsu	1312
D-2092	{GalNAc3K2AhxC6}ccugcuUfcAfUfGfCfccuucasusu	1313	{Фочфат}usAfsGfAfaGfGfgcauGfaAfgcaggsusu	1314
D-2093	{GalNAc3K2AhxC6}uucaugCfcCfUfUfCfuacaguususu	1315	{Фочфат}asAfsCfUfgUfAfgaagGfgCfaugaasusu	1316
D-2094	{GalNAc3K2AhxC6}uucaugCfcCfUfUfCfuacagugsusu	1317	{Фочфат}csAfsCfUfgUfAfgaagGfgCfaugaasusu	1318
D-2095	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUfgCfCfCfUfucuacaususu	1319	{Фочфат}asUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagsusu	1320
D-2096	{GalNAc3K2AhxC6}gguccaGfcCfUfGfAfacuucuuususu	1321	{Фочфат}asAfsGfAfaGfUfucagGfcUfggaccsusu	1322
D-2097	{GalNAc3K2AhxC6}GfcGfgCfuUfcCfUfGfGfgcUfuCfuAfsusUf	1323	{Фочфат}usAfsGfAfaGfCfccagGfaAfgCfcGfcsUfsu	1324
D-2098	{GalNAc3K2AhxC6}GfcGfgCfuUfcCfuGfGfgcUfuCfuAfsusUf	1325	{Фочфат}usAfsGfAfaGfCfccAfgGfaAfgCfcGfcsUfsu	1326
D-2099	{GalNAc3K2AhxC6}GfuUfcCfuGfcUfUfCfAfugCfcCfuUfsusUf	1327	{Фочфат}asAfsGfGfCfAfugaaGfcAfgGfaAfcUfsu	1328

D-2100	{GalNAc3K2AhxC6}GfuUfcCfuGfcUfuCfAfugCfcCfuUfsusUf	1329	{Φocφar}asAfsGfgCfAfuGafaGfcAfgGfaAfcUfsu	1330
D-2101	{GalNAc3K2AhxC6}CfcUfgCfuUfcAfUfGfCfccUfuCfuAfsusUf	1331	{Φocφar}usAfsGafaGfGfgcauGfaAfgCfaGfgsUfsu	1332
D-2102	{GalNAc3K2AhxC6}CfcUfgCfuUfcAfuGfCfccUfuCfuAfsusUf	1333	{Φocφar}usAfsGafaGfGfgcAfuGfaAfgCfaGfgsUfsu	1334
D-2103	{GalNAc3K2AhxC6}augcccUfcUfUfAfCfaguggccsusu	1335	{Φocφar}gsGfscCfaCfUfguagAfaGfggcaususu	1336
D-2104	{GalNAc3K2AhxC6}auggcUfcCfAfGfAfuaugccsusu	1337	{Φocφar}asGfsgCfaUfAfucugGfaAfgccaususu	1338
D-2105	{GalNAc3K2AhxC6}gugacaAfcGfUfAfCfccuacaususu	1339	{Φocφar}asUfsgAfaGfGfguacGfuUfguacaususu	1340
D-2106	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugsusu	1341	{Φocφar}gsCfsaUfgAfAfgcAfgGfaAfcuacaususu	1342
D-2107	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugsusu	1343	{Φocφar}gsCfsaUfgAfAfgcagGfaAfcuacaususu	1344
D-2108	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugsusu	1345	{Φocφar}gsCfsaUfgAfAfgcAfgGfaAfcuacaususu	1346
D-2109	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugscsu	1347	{Φocφar}asGfsgCfaUfgAfAfgcagGfaAfcuacaususu	1348
D-2110	{GalNAc3K2AhxC6}uggauGfuUfCfCfUfgcucaugsu	1349	{Φocφar}gsCfsaUfgAfaGfCfaggaAfcAfuaccasusu	1350
D-2111	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugsu	1351	{Φocφar}gsCfsaUfgAfAfgcagGfaAfcuacaususu	1352
D-2112	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucauges{invAb}	1353	{Φocφar}gsCfsaUfgAfAfgcagGfaAfcuacaususu	1354
D-2113	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuCfaUfgCfCfUfucUfaCfaUfsusUf	1355	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaGfgCfaUfgAfaGfcsUfsu	1356
D-2114	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuCfaUfgCfcCfUfucUfaCfaUfsusU	1357	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaGfgCfaUfgAfaGfcsUfsu	1358

	f			
D-2115	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuaucususu	1359	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa Ufgaagcsusu	1360
D-2116	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucUfaCfaUfsusUf	1361	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa Ufgaagcsusu	1362
D-2117	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucuaucususu	1363	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa Ufgaagcsusu	1364
D-2118	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuaucususu	1365	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa UfgAfaGfcsUfsu	1366
D-2119	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuaucususu	1367	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	1368
D-2120	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucUfaCfaUfsus Uf	1369	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa Ufgaagcsusu	1370
D-2121	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucuaucususu	1371	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1372
D-2122	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucUfaCfaUfsusUf	1373	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa UfgAfaGfcsUfsu	1374
D-2123	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucUfaCfaUfsusUf	1375	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1376
D-2124	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucuaucususu	1377	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa UfgAfaGfcsUfsu	1378
D-2125	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucuaucususu	1379	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	1380
D-2126	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucUfaCfaUfsusUf	1381	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	1382
D-2127	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucUfaCfaUfsus Uf	1383	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1384
D-2128	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfgCfCfCfUfucUfaCfaUfsus Uf	1385	{Фочфар}asusguaGfAfagggCfa UfgAfaGfcsUfsu	1386
D-2129	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf g[dC]CfCfuucuaucususu	1387	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1388

D-2130	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCf[dC]Ufucuacaususu	1389	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1390
D-2131	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCf[dC]CfUfucuacaususu	1391	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1392
D-2132	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1393	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfagGfg CfaUfgaagcsusu	1394
D-2133	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfcCfUfucuacaususu	1395	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1396
D-2134	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfcCfUfucuacaususu	1397	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfagGfg CfaUfgaagcsusu	1398
D-2135	{GalNAc3K2AhxC6}GfscsUfu CfaUfgCfcCfUfucUfaCfaUfsus Uf	1399	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	1400
D-2136	{GalNAc3K2AhxC6}GfscsUfu CfaUfgCfcCfCfUfucUfaCfaUfs usUf	1401	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfagGfg CfaUfgAfaGfcsUfsu	1402
D-2137	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacagsusu	1403	{Фочфар}asAfsUfgUfaGfAfag ggCfaUfgaagcsusu	1404
D-2138	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuuCf aUfGfCfCfcuucuacsasu	1405	{Фочфар}asUfsgUfaGfaAfGfgg caUfgAfagcagsusu	1406
D-2139	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacsasu	1407	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1408
D-2140	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaus{invAb}	1409	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1410
D-2141	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacauus{invAb}	1411	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1412
D-2142	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1413	{Фочфар}AfsusGfuAfgAfaggg CfaUfgaagcsusu	1414
D-2143	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfuCfuacaususu	1415	{Фочфар}AfsusGfuAfgAfaggg CfaUfgaagcsusu	1416
D-2144	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaug CfCfCfUfucuacaususu	1417	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg CfaUfgaagcsusu	1418
D-2145	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1419	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaggg Cfaugaagcsusu	1420

D-2146	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1421	{Фочфат}asusgUfaGfAfagggCf aUfgaagcsusu	1422
D-2147	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1423	{Фочфат}asUfsgUfagAfagggCf aUfgaagcsusu	1424
D-2148	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1425	{Фочфат}asusgUfagAfagggCfa Ufgaagcsusu	1426
D-2149	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1427	{Фочфат}asUfsguagAfagggCfa Ufgaagcsusu	1428
D-2150	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUf gCfCfCfUfucuacaususu	1429	{Фочфат}asusguagAfagggCfaU fgaagcsusu	1430
D-2151	{GalNAc3K2AhxC6}guauguU fcCfUfGfCfucaugcus{invAb }	1431	{Фочфат}gsCfsaUfgAfAfgcag GfaAfcuacausu	1432
D-2152	{GalNAc3K2AhxC6}gguaugU fuCfCfUfGfcuacaususu	1433	{Фочфат}aAfsuGfaAfGfcaggAf aCfauaccsusu	1434
D-2153	{GalNAc3K2AhxC6}guauguU fcCfUfGfCfucaugcusu	1435	{Фочфат}asCfsaUfgAfAfgcagG faAfcuacausu	1436
D-2154	{GalNAc3K2AhxC6}cgcccaAf uGfUfCfCfaccagcsusu	1437	{Фочфат}asGfscUfgGfUfggac AfuUfgccgsusu	1438
D-2155	{GalNAc3K2AhxC6}uggagcA fgAfCfUfCfugcaggcsusu	1439	{Фочфат}asCfscUfgCfAfgaguC fuGfcuccasusu	1440
D-2156	{GalNAc3K2AhxC6}acguacCf cUfUfCfAfuugaugususu	1441	{Фочфат}aCfsaUfcAfAfugaaGf gGfuacgsusu	1442
D-2157	{GalNAc3K2AhxC6}ccagagAf cUfGfGfUfgacaugususu	1443	{Фочфат}asCfsaUfgUfCfaccag fuCfucuggsusu	1444
D-2158	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]g cuucaUfgCfCfUfUfucuacaus u	1445	{Фочфат}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcsusu	1446
D-2159	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]g cuucaUfgCfCfUfUfucuacaus u	1447	{Фочфат}asAfsaUfgUfaGfAfaa ggCfaUfgaagcsusu	1448
D-2160	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]g cuucaUfgCfcUfUfUfCfuacaus su	1449	{Фочфат}asAfsaUfgUfAfgaaaG fgCfaUfgaagcsusu	1450

D-2161	{GalNAc3K2AhxC6}ugcnuCAfuGfCfCfUfuucuacasusu	1451	{Фочфат}usGfsuAfgAfAfggcAfuGfaagcasusu	1452
D-2162	{GalNAc3K2AhxC6}uanguuCfcUfGfCfUfucaugcususu	1453	{Фочфат}asGfscAfuGfAfgcaGfgAfacaucasusu	1454
D-2163	{GalNAc3K2AhxC6}uuccugCfuUfCfAfUfgccuuuususu	1455	{Фочфат}asAfsaAfgGfCfaugaAfgCfaggaasusu	1456
D-2164	{GalNAc3K2AhxC6}ucaugcCfuUfUfCfUfacagugususu	1457	{Фочфат}asCfsaCfuGfUfagaaAfgGfcaugasusu	1458
D-2165	{GalNAc3K2AhxC6}caugccUfuUfCfUfAfcaguggususu	1459	{Фочфат}asCfscAfcUfGfuagaAfaGfgcaugsusu	1460
D-2166	{GalNAc3K2AhxC6}augccuUfuCfUfAfCfaguggcususu	1461	{Фочфат}asGfscCfaCfUfaguAfaAfggcaususu	1462
D-2167	{GalNAc3K2AhxC6}gguaugUfuCfCfUfGfucuauasusu	1463	{Фочфат}usAfsuGfaAfGfgcaggAfaCfauaccsusu	1464
D-2168	{GalNAc3K2AhxC6}guauguUfcCfUfGfCfuucaugasusu	1465	{Фочфат}usCfsaUfgAfAfgcagGfaAfcuacsusu	1466
D-2169	{GalNAc3K2AhxC6}uanguuCfcUfGfCfUfucaugasusu	1467	{Фочфат}usGfscAfuGfAfgcaGfgAfacaucasusu	1468
D-2170	{GalNAc3K2AhxC6}uuccugCfuUfCfAfUfgccuuuasusu	1469	{Фочфат}usAfsaAfgGfCfaugaAfgCfaggaasusu	1470
D-2171	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuuCfaUfGfCfCfuucuauasusu	1471	{Фочфат}usUfsaGfaAfAfggcaUfgAfagcagsusu	1472
D-2172	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUfgCfCfUfUfucuacaasusu	1473	{Фочфат}usUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcsusu	1474
D-2173	{GalNAc3K2AhxC6}uuccugCfcUfUfUfCfuacaguasusu	1475	{Фочфат}usApscUfgUfAfgaaaGfgCfaugaasusu	1476
D-2174	{GalNAc3K2AhxC6}ucaugcCfuUfUfCfUfacagugasusu	1477	{Фочфат}usCfsaCfuGfUfagaaAfgGfcaugasusu	1478
D-2175	{GalNAc3K2AhxC6}caugccUfuUfCfUfAfcaguggasusu	1479	{Фочфат}usCfscAfcUfGfuagaAfaGfgcaugsusu	1480
D-2176	{GalNAc3K2AhxC6}augccuUfuCfUfAfCfaguggcasusu	1481	{Фочфат}usGfscCfaCfUfaguAfaAfggcaususu	1482
D-2177	{GalNAc3K2AhxC6}acguacCfcUfUfCfAfuugaugasusu	1483	{Фочфат}usCfsaUfcAfAfgaaGfgGfuacgususu	1484

D-2178	{GalNAc3K2AhxC6}ccagagAfcUfGfGfUfgacaugasusu	1485	{Фoсфaт}usCfsaUfgUfCfaccagGfuCfucuggsusu	1486
D-2179	{GalNAc3K2AhxC6}auggeUfcCfAfGfAfuauccasusu	1487	{Фoсфaт}usGfsgCfaUfAfucugGfaAfgccasusu	1488
D-2180	{GalNAc3K2AhxC6}guuccuGfcUfUfCfAfugccuuususu	1489	{Фoсфaт}asAfsaGfgCfAfugaaGfcAfggaacsusu	1490
D-2181	{GalNAc3K2AhxC6}ccugcuUfcAfUfGfCfcuuucuasusu	1491	{Фoсфaт}usAfsGfAfaGfgcauGfaAfgcaggsusu	1492
D-2182	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUfgCfCfUfUfucuaucasusu	1493	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagsusu	1494
D-2183	{GalNAc3K2AhxC6}cuucaUgfcCfUfUfucuaucasusu	1495	{Фoсфaт}asCfsuGfuAfGfaaagGfcAfuagaacsusu	1496
D-2184	{GalNAc3K2AhxC6}uucaugCfcUfUfUfCfuacaguususu	1497	{Фoсфaт}asAfsCfUfgUfAfgaaGfgCfaugaacsusu	1498
D-2185	{GalNAc3K2AhxC6}gcuucaUfcCfCfUfUfucuaucasusu	1499	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggGfaUfgaagsusu	1500
D-2186	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCfCfUfucuaucasusu	1501	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagsusu	1502
D-2187	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCfCfUfucuaucasusu	1503	{Фoсфaт}asAfsaUfgUfaGfAfaaggCfaUfgaagsusu	1504
D-2188	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcCfUfUfCfuacausu	1505	{Фoсфaт}asAfsaUfgUfAfgaagGfgCfaUfgaagsusu	1506
D-2189	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]geggcuUfcCfUfGfGfgcuucasusu	1507	{Фoсфaт}usAfsGfAfaGfcfccagGfaAfgccgsusu	1508
D-2190	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuGfcGfgCfuUfcCfuGfGfgcUfuCfsusAf	1509	{Фoсфaт}usAfsGfAfaGfcfccAfgGfaAfgCfcGfcAfgsUfsu	1510
D-2191	{GalNAc3K2AhxC6}cugcggCfuUfCfCfUfgggcuucus{invAb}	1511	{Фoсфaт}usAfsGfAfaGfcCfcfaggaAfgCfcgagsusu	1512
D-	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]c	1513	{Фoсфaт}usAfsGfAfaGfcCfcfag	1514

2192	ugcggCfuUfCfCfUfggcuucus a		gaAfgCfcgagsusu	
D- 2193	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]g cggcuUfcCfUfGfGfGfcUfuCfuA fsusUf	1515	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcagG faAfgccgcsusu	1516
D- 2194	{GalNAc3K2AhxC6}cugcggCf uUfCfCfUfgGfGfcUfuCfus{inv Ab}	1517	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcfag gaAfgCfcgagsusu	1518
D- 2195	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]c ugcggCfuUfCfCfUfgGfGfcUfuC fsusAf	1519	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcfag gaAfgCfcgagsusu	1520
D- 2196	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]G fcGfGfcUfuCfuGfGfGfcUfuCf uAfsusUf	1521	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcAfg GfaAfgCfcGfcsUfsu	1522
D- 2197	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcG fgCfuUfcCfUfgGfGfcUfuCfus{i nvAb}	1523	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcfag GfaAfgCfcGfcAfgsUfsu	1524
D- 2198	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]C fuGfcGfGfcUfuCfUfgGfGfcUf uCfsusAf	1525	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcfag GfaAfgCfcGfcAfgsUfsu	1526
D- 2199	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]G fcGfGfcUfuCfUfGfGfGfcuucu asusu	1527	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcagG faAfgCfcGfcsUfsu	1528
D- 2200	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]C fuGfcGfGfcUfuCfCfUfggcuu csusa	1529	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcfag gaAfgCfcGfcAfgsUfsu	1530
D- 2201	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]c ugcggcuUfcCfUfGfGfGfcUfuCf usAf	1531	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcagG faAfgccgagsusu	1532
D- 2202	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]C fuGfcGfGfcUfuCfUfGfGfGfcu ucsusa	1533	{Фoсфap}usAfsGfAfaGfcCfcagG faAfgCfcGfcAfgsUfsu	1534
D- 2203	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]a uggcuUfcCfAfgGfAfuugccusus	1535	{Фoсфap}asGfsgCfaUfAfcug GfaAfgccaususu	1536

	u			
D-2204	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfcAfuGfgCfuUfcCfaGfAfuaUfgCfscsUf	1537	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfgGfaAfgCfcAfuGfusUfsu	1538
D-2205	{GalNAc3K2AhxC6}acauggCfuUfCfCfAfgauaugccs{invAb}	1539	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfggaAfgCfcaugususu	1540
D-2206	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]acauggCfuUfCfCfAfgauaugccsesu	1541	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfggaAfgCfcaugususu	1542
D-2207	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]auggcuUfcCfAfgGfAfuaUfgCfcUfsusUf	1543	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfgGfaAfgccaususu	1544
D-2208	{GalNAc3K2AhxC6}acauggCfuUfCfCfAfgaUfaUfgCfcs{invAb}	1545	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfggaAfgCfcaugususu	1546
D-2209	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]acauggCfuUfCfCfAfgaUfaUfgCfscsUf	1547	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfggaAfgCfcaugususu	1548
D-2210	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfuGfgCfuUfcCfaGfAfuaUfgCfcUfsusUf	1549	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfgGfaAfgCfcAfusUfsu	1550
D-2211	{GalNAc3K2AhxC6}AfcAfuGfgCfuUfcCfAfgaUfaUfgCfcs{invAb}	1551	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfgGfaAfgCfcAfuGfusUfsu	1552
D-2212	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfcAfuGfgCfuUfcCfAfgaUfaUfgCfscsUf	1553	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfgGfaAfgCfcAfuGfusUfsu	1554
D-2213	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfuGfgCfuUfcCfAfgGfAfuaugccususu	1555	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfgGfaAfgCfcAfusUfsu	1556
D-2214	{GalNAc3K2AhxC6}AfcAfuGfgCfuUfCfCfAfgauaugccs{invAb}	1557	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfggaAfgCfcAfuGfusUfsu	1558
D-	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]A	1559	{Φocφar}asGfsgCfaUfaUfcUfg	1560

2215	fcAfuGfgCfuUfCfCfAfgauaug cscsu		gaAfgCfcAfuGfusUfsu	
D- 2216	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]a cauggcuUfcCfAfGfAfuaugcscs u	1561	{Φocφar}asGfsgCfaUfAfucug GfaAfgccaugususu	1562
D- 2217	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]a cauggcuUfcCfAfGfAfuaUfgCf csUf	1563	{Φocφar}asGfsgCfaUfAfucug GfaAfgccaugususu	1564
D- 2218	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]A fcAfuGfgCfuUfcCfAfGfAfua gscsu	1565	{Φocφar}asGfsgCfaUfAfucug GfaAfgCfcAfuGfusUfsu	1566
D- 2219	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]a cguacCfcUfUfCfAfuaugausus u	1567	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugaaG fgGfuacgususu	1568
D- 2220	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]C faAfcGfuAfcCfcUfuCfAfuGf aUfsgsUf	1569	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugAfa GfgGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1570
D- 2221	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]c aacguAfcCfCfUfUfcauugaug s u	1571	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaa ggGfuAfcguugsusu	1572
D- 2222	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]a cguacCfcUfUfCfAfuGfaUfgU fsusUf	1573	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugaaG fgGfuacgususu	1574
D- 2223	{GalNAc3K2AhxC6}caacguAf cCfCfUfUfcaUfuGfaUfsgs{inv Ab}	1575	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaa ggGfuAfcguugsusu	1576
D- 2224	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]A fcGfuAfcCfcUfuCfAfuGfaUf gUfsusUf	1577	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugAfa GfgGfuAfcGfusUfsu	1578
D- 2225	{GalNAc3K2AhxC6}CfaAfcG fuAfcCfcUfUfcaUfuGfaUfsgs{i nvAb}	1579	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaa GfgGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1580
D- 2226	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]C faAfcGfuAfcCfcUfUfcaUfuGf	1581	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaa GfgGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1582

	aUfsgsUf			
D-2227	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfcGfuAfcCfcUfUfCfAfuugaugususu	1583	{Фочфар}asCfsaUfcAfaUfGfaafgGfuAfcGfusUfsu	1584
D-2228	{GalNAc3K2AhxC6}CfaAfcGfuAfcCfCfUfUfcauugaugs[invAb]	1585	{Фочфар}asCfsaUfcAfaUfGfaaggGfuAfcGfuUfGsuUfsu	1586
D-2229	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfaAfcGfuAfcCfCfUfUfcauugaugausgsu	1587	{Фочфар}asCfsaUfcAfaUfGfaaggGfuAfcGfuUfGsuUfsu	1588
D-2230	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]caacguacCfcUfUfCfAfuugaugsu	1589	{Фочфар}asCfsaUfcAfaUfGfaafgGfuacguugsusu	1590
D-2231	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]caacguacCfcUfUfCfAfuUGfaUfGsuUf	1591	{Фочфар}asCfsaUfcAfaUfGfaafgGfuacguugsusu	1592
D-2232	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfaAfcGfuAfcCfcUfUfCfAfuugaugsu	1593	{Фочфар}asCfsaUfcAfaUfGfaafgGfuAfcGfuUfGsuUfsu	1594
D-2233	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuasasu	1595	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1596
D-2234	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucUfaCfsasUf	1597	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1598
D-2235	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucUfaCfaUfsusUf	1599	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgAfaGfcsUfsu	1600
D-2236	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuaususu	1601	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcsUfsu	1602
D-2237	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcUfuCfaUfgCfcUfUfucUfaCfsasUf	1603	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgAfaGfcAfgsUfsu	1604
D-2238	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuasasu	1605	{Фочфар}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcAfgsUfsu	1606

D-2239	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuGfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1607	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcAfgsUfsu	1608
D-2240	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuaacs{invAb}	1609	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1610
D-2241	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuGfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1611	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1612
D-2242	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCf[dC]UfUfucuaacsasu	1613	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1614
D-2243	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1615	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgaagcagsusu	1616
D-2244	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1617	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgaagcagsusu	1618
D-2245	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1619	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1620
D-2246	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacs{invAb}	1621	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1622
D-2247	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1623	{Фoсфap}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1624
D-2248	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1625	{Фoсфap}asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1626
D-2249	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacs{invAb}	1627	{Фoсфap}asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1628
D-2250	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1629	{Фoсфap}asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1630
D-2251	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacs{invAb}	1631	{Фoсфap}asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1632
D-2252	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacsasu	1633	{Фoсфap}asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1634

	u			
D-2253	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucUfaCfaUfsusUf	1635	{Φocφar}asUfsgUfagAfaaGfgCfaUfgAfaGfcsUfsu	1636
D-2254	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucuaucasusu	1637	{Φocφar}asUfsgUfagAfaaggCfaUfgAfaGfcsUfsu	1638
D-2255	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucuaucasusu	1639	{Φocφar}asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagsusu	1640
D-2256	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcUfUfucuaucasusu	1641	{Φocφar}asUfsgUfagAfaaGfgCfaUfgaagsusu	1642
D-2257	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcUfUfucuaucasusu	1643	{Φocφar}asUfsgUfagAfaaGfgCfaUfgaagsusu	1644
D-2258	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfcUfUfucuasasu	1645	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1646
D-2259	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcUfUfucUfaCfaUfsusUf	1647	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1648
D-2260	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucUfaCfaUfsusUf	1649	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcsUfsu	1650
D-2261	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucuaucasusu	1651	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcsUfsu	1652
D-2262	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfcUfUfucuas{invAb}	1653	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1654
D-2263	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfcUfUfucuasusu	1655	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1656
D-2264	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucuaucasusu	1657	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1658

D-2265	{GalNAc3K2AhxC6}anguucCfuGfCfUfUfcaugccususu	1659	{Фочар}asGfsgCfaUfGfaagCfaGfaacaususu	1660
D-2266	{GalNAc3K2AhxC6}uguuccUfgCfUfUfCfaugccususu	1661	{Фочар}asAfsGfCfaUfGfaagCfaGfaacaususu	1662
D-2267	{GalNAc3K2AhxC6}ugccuuUfcUfAfcAfcAfguggccususu	1663	{Фочар}asGfsgCfcAfcFuguaGfaAfcagccaususu	1664
D-2268	{Biotin-C6}cguacuUfcGfUfCfcFuuguaugsusu	1665	{Фочар}csAfsuAfcAfcAfcagCfaAfcuagccususu	1666
D-2269	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCf[dC]CfUfucuaucusu	1667	{Фочар}asUfsgUfaGfAfcagCfaUfGfaagccususu	1668
D-2270	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcCfcUfucuaucusu	1669	{Фочар}asUfsgUfaGfAfcagCfaUfGfaagccususu	1670
D-2271	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcCfcUfucuaucusu	1671	{Фочар}asUfsgUfaGfAfcagCfaUfGfaagccususu	1672
D-2272	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcCfcUfucuaucusu	1673	{Фочар}asUfsgUfaGfAfcagCfaUfGfaagccususu	1674
D-2273	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfcCfcUfucuaucusu	1675	{Фочар}asUfsgUfaGfAfcagCfaUfGfaagccususu	1676
D-2274	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcCfcUfucuaucusu	1677	{Фочар}asUfsgUfaGfAfcagCfaUfGfaagccususu	1678
D-2275	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ccugcuUfcAfcUfGfcfcUfuCfuAfsusUf	1679	{Фочар}usAfsGfAfcAfcGfcGfaAfcagccususu	1680
D-2276	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfcUfgCfuUfcAfcGfcfcUfuCfuAfsusUf	1681	{Фочар}usAfsGfAfcAfcGfcGfaAfcagccususu	1682
D-2277	{sGalNAc3K2AhxC6}UfuCfcUfgCfuUfcAfcGfcfcUfuCfus	1683	{Фочар}usAfsGfAfcAfcGfcGfaAfcagccususu	1684

	{invAb}			
D-2278	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] CfcUfgCfuUfcAfUfGfCfcuuuc uasusu	1685	{Фочар}usAfsGfAfaAfGfgcau GfaAfgCfaGfGfUfsu	1686
D-2279	{sGalNAc3K2AhxC6}UfuCfc UfgCfuUfcAfUfGfcuuuc{in vAb}	1687	{Фочар}usAfsGfAfaAfGfCfau gaAfgCfaGfGfAfasUfsu	1688
D-2280	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] augccuUfuCfuAfCfaguggcusu su	1689	{Фочар}asGfscCfaCfuGfuagA faAfggcaususu	1690
D-2281	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] augccuUfuCfuAfCfagUfgGfc UfsusUf	1691	{Фочар}asGfscCfaCfuGfuagA faAfggcaususu	1692
D-2282	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] AfuGfcCfuUfuCfuAfCfagUfg GfcUfsusUf	1693	{Фочар}asGfscCfaCfuGfuAfg AfaAfgGfcAfusUfsu	1694
D-2283	{sGalNAc3K2AhxC6}UfcAfu GfcCfuUfuCfuUfacAfgUfgGfcs {invAb}	1695	{Фочар}asGfscCfaCfuGfuGfag AfaAfgGfcAfuGfasUfsu	1696
D-2284	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] AfuGfcCfuUfuCfuAfCfagugg cususu	1697	{Фочар}asGfscCfaCfuGfuagA faAfgGfcAfusUfsu	1698
D-2285	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfcAfuGfcCfuUfuCfuUfacagu ggscsu	1699	{Фочар}asGfscCfaCfuGfuGfag aaAfgGfcAfuGfasUfsu	1700
D-2286	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugcuucAfuGfcCfuUfuucacag su	1701	{Фочар}asCfsuGfuAfgAfAfag gcAfuGfaagcasusu	1702
D-2287	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfuUfuUfcuAfcAfg UfsusUf	1703	{Фочар}asCfsuGfuAfgfaagG fcAfuGaagsusu	1704
D-2288	{sGalNAc3K2AhxC6}UfgCfu UfcAfuGfcCfuUfuCfuAfcAfgs {invAb}	1705	{Фочар}asCfsuGfuAfgAfAfag GfcAfuGfaAfgCfasUfsu	1706

D-2289	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] CfuUfcAfuGfcCfUfUfUfcuaca gususu	1707	{Фочфат}asCfsuGfuAfgfaagG fcAfuGfaAfgsUfsu	1708
D-2290	{sGalNAc3K2AhxC6}UfgCfu UfcAfuGfcCfUfUfcuacags{in vAb}	1709	{Фочфат}asCfsuGfuAfgAfAfag gcAfuGfaAfgCfasUfsu	1710
D-2291	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfgCfuUfcAfuGfcCfUfUfcua casgsu	1711	{Фочфат}asCfsuGfuAfgAfAfag gcAfuGfaAfgCfasUfsu	1712
D-2292	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugeuucauGfcCfUfUfUfcuacag su	1713	{Фочфат}asCfsuGfuAfgfaagG fcAfugaagcasusu	1714
D-2293	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugeuucauGfcCfUfUfUfcuAfcA fgsUf	1715	{Фочфат}asCfsuGfuAfgfaagG fcAfugaagcasusu	1716
D-2294	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfgCfuUfcAfuGfcCfUfUfUfcu acasgsu	1717	{Фочфат}asCfsuGfuAfgfaagG fcAfuGfaAfgCfasUfsu	1718
D-2295	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] guuccuGfcUfUfCfAfugccuus usu	1719	{Фочфат}asAfsaGfgCfAfugaaG fcAfggaacsusu	1720
D-2296	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ccugeuUfcAfUfGfCfcuuucuas su	1721	{Фочфат}usAfsGfAfaAfGfgcau GfaAfgcaggsusu	1722
D-2297	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUfUfUfcuacag su	1723	{Фочфат}asCfsuGfuAfgfaagG fcAfugaagsusu	1724
D-2298	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfuCfcUfgCfuUfcAfuGfcfeu UfuCfsusAf	1725	{Фочфат}usAfsGfAfaAfGfgcAfu GfaAfgCfaGfgAfasUfsu	1726
D-2299	{sGalNAc3K2AhxC6}uuccug CfuUfCfAfUfgccuuucus{invA b}	1727	{Фочфат}usAfsGfAfaAfgGfcfau gaAfgCfaggaasusu	1728
D-	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]	1729	{Фочфат}usAfsGfAfaAfgGfcfau	1730

2300	uuccugCfuUfCfAfUfgccuuucsusa		gaAfgCfaggaasusu	
D-2301	{sGalNAc3K2AhxC6}uuccugCfuUfCfAfUfgcCfuUfuCfus{invAb}	1731	{Фочфат}usAfgAfaAfgGfCfau gaAfgCfaggaasusu	1732
D-2302	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugCfuUfCfAfUfgcCfuUfuCfsusAf	1733	{Фочфат}usAfgAfaAfgGfCfau gaAfgCfaggaasusu	1734
D-2303	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfuCfcUfgCfuUfcAfUfgcCfuUfuCfsusAf	1735	{Фочфат}usAfgAfaAfgGfCfau GfaAfgCfaGfgAfasUfsu	1736
D-2304	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfuCfcUfgCfuUfCfAfUfgccuuucsusa	1737	{Фочфат}usAfgAfaAfgGfCfau gaAfgCfaGfgAfasUfsu	1738
D-2305	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugcuUfcAfUfGfCfcuuucsusa	1739	{Фочфат}usAfgAfaAfGfgcau GfaAfgcaggaasusu	1740
D-2306	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugcuUfcAfUfGfCfcuUfuCfusAf	1741	{Фочфат}usAfgAfaAfGfgcau GfaAfgcaggaasusu	1742
D-2307	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfuCfcUfgCfuUfcAfUfGfCfcuuucsusa	1743	{Фочфат}usAfgAfaAfGfgcau GfaAfgCfaGfgAfasUfsu	1744
D-2308	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfcAfuGfcCfuUfuCfuAfCfagUfgGfscsUf	1745	{Фочфат}asGfscCfaCfuUfguAfgAfaAfgGfcAfuGfasUfsu	1746
D-2309	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcCfuUfUfCfUfacaguggcs{invAb}	1747	{Фочфат}asGfscCfaCfuGfUfagaaAfgGfcaugasusu	1748
D-2310	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugcCfuUfUfCfUfacaguggcsu	1749	{Фочфат}asGfscCfaCfuGfUfagaaAfgGfcaugasusu	1750
D-2311	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcCfuUfUfCfUfacAfgUfgGfcs{invAb}	1751	{Фочфат}asGfscCfaCfuGfUfagaaAfgGfcaugasusu	1752

D-2312	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ucaugcCfuUfUfCfUfacAfgUfg GfscsUf	1753	{Φocφar}asGfscCfaCfuGfUfag aaAfgGfcaugasusu	1754
D-2313	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfcAfuGfcCfuUfuCfUfacAfg UfgGfscsUf	1755	{Φocφar}asGfscCfaCfuGfUfag AfaAfgGfcAfuGfasUfsu	1756
D-2314	{sGalNAc3K2AhxC6}UfcAfu GfcCfuUfUfCfUfacaguggcs{in vAb}	1757	{Φocφar}asGfscCfaCfuGfUfag aaAfgGfcAfuGfasUfsu	1758
D-2315	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggsc su	1759	{Φocφar}asGfscCfaCfUfguagA faAfggcaugasusu	1760
D-2316	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ucaugccuUfuCfUfAfCfagUfgG fesUf	1761	{Φocφar}asGfscCfaCfUfguagA faAfggcaugasusu	1762
D-2317	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfcAfuGfcCfuUfuCfUfAfCfag uggscsu	1763	{Φocφar}asGfscCfaCfUfguagA faAfgGfcAfuGfasUfsu	1764
D-2318	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] UfgCfuUfcAfuGfcCfuUfUfcu AfcAfsUf	1765	{Φocφar}asCfsuGfuAfgAfaAfg GfcAfuGfaAfgCfasUfsu	1766
D-2319	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuc AfuGfCfCfUfuucacags{invA b}	1767	{Φocφar}asCfsuGfuAfgAfaAfg gcAfuGfaagcasusu	1768
D-2320	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuc AfuGfCfCfUfuucfuAfcAfgs{i nvAb}	1769	{Φocφar}asCfsuGfuAfgAfaAfg gcAfuGfaagcasusu	1770
D-2321	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugcuucAfuGfCfCfUfuucfuAfc AfsUf	1771	{Φocφar}asCfsuGfuAfgAfaAfg gcAfuGfaagcasusu	1772
D-2322	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] CfuUfcAfuGfcCfuUfUfcuAfc AfgUfsUf	1773	{Φocφar}asCfsuGfuAfgAfaAfg GfcAfuGfaAfgsUfsu	1774
D-	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]	1775	{Φocφar}asCfsuGfuAfgAfaAfg	1776

2323	UfgCfuUfcAfuGfcCfuUfuCfu AfcAfsGsUf		GfcAfuGfaAfgCfasUfsu	
D- 2324	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfgCfCfuUfucuaucasu su	1777	{Фочфат}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagsusu	1778
D- 2325	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] caugccUfuUfCfuUfAfcaguggusu su	1779	{Фочфат}asCfscAfcUfGfuagaA faGfgcaugsusu	1780
D- 2326	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuuCfaUfGfCfCfuucuaasu su	1781	{Фочфат}usUfsaGfaAfAfggca UfgAfacagsusu	1782
D- 2327	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfgCfCfuUfucuaaasu su	1783	{Фочфат}usUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagsusu	1784
D- 2328	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] uucaugCfCfuUfCfuacaguasu su	1785	{Фочфат}usApscUfgUfAfgaaa GfgCfaugaasusu	1786
D- 2329	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] guuccuGfcUfUfCfAfugCfcUfu UfsusUf	1787	{Фочфат}asAfsaGfgCfAfugaaG fcAfggaacsusu	1788
D- 2330	{sGalNAc3K2AhxC6}auguuc CfuGfCfuUfcaUfgCfcUfus{in vAb}	1789	{Фочфат}asAfsaGfgCfaUfGfaa gcAfgGfaacaususu	1790
D- 2331	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] auguucCfuGfCfuUfcaUfgCfc UfsusUf	1791	{Фочфат}asAfsaGfgCfaUfGfaa gcAfgGfaacaususu	1792
D- 2332	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] GfuUfcCfuGfcUfuCfAfugCfc UfuUfsusUf	1793	{Фочфат}asAfsaGfgCfAfugAfa GfcAfgGfaAfcUfsu	1794
D- 2333	{sGalNAc3K2AhxC6}AfuGfu UfcCfuGfcUfUfcaUfgCfcUfus {invAb}	1795	{Фочфат}asAfsaGfgCfaUfGfaa GfcAfgGfaAfcAfusUfsu	1796
D- 2334	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] AfuGfuUfcCfuGfcUfUfcaUfg	1797	{Фочфат}asAfsaGfgCfaUfGfaa GfcAfgGfaAfcAfusUfsu	1798

	CfcUfsusUf			
D-2335	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] GfuUfcCfuGfcUfUfCfAfugccu uususu	1799	{Фочфат}asAfsaGfgCfAfugaaG fcAfgGfaAfcUfsu	1800
D-2336	{sGalNAc3K2AhxC6}AfuGfu UfcCfuGfCfUfUfcaugccuus{in vAb}	1801	{Фочфат}asAfsaGfgCfaUfGfaa gcAfgGfaAfcAfusUfsu	1802
D-2337	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] AfuGfuUfcCfuGfCfUfUfcaugc cususu	1803	{Фочфат}asAfsaGfgCfaUfGfaa gcAfgGfaAfcAfusUfsu	1804
D-2338	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] auguuccuGfcUfUfCfAfugccusu su	1805	{Фочфат}asAfsaGfgCfAfugaaG fcAfpgaacaususu	1806
D-2339	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] auguuccuGfcUfUfCfAfugCfcU fusUf	1807	{Фочфат}asAfsaGfgCfAfugaaG fcAfpgaacaususu	1808
D-2340	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] GfcUfuCfaUfgCfcUfuUfCfuaC faGfsusAf	1809	{Фочфат}usAfscUfgUfAfgaAfa GfgCfaUfgAfaGfcsUfsu	1810
D-2341	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] geuucaUfgCfCfUfUfucacagsu sa	1811	{Фочфат}usAfscUfgUfaGfAfaa ggCfaUfgaagesusu	1812
D-2342	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] uucaugCfcUfUfUfCfuaCfaGfu AfsusUf	1813	{Фочфат}usAfscUfgUfAfgaaa GfgCfaugaasusu	1814
D-2343	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] geuucaUfgCfCfUfUfucUfaCfa GfsusAf	1815	{Фочфат}usAfscUfgUfaGfAfaa ggCfaUfgaagesusu	1816
D-2344	{sGalNAc3K2AhxC6}GfcUfu CfaUfgCfCfUfUfucacagus{in vAb}	1817	{Фочфат}usAfscUfgUfaGfAfaa ggCfaUfgAfaGfcsUfsu	1818
D-2345	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] GfcGfgCfuUfcCfUfGfGfgcuuc uasusu	1819	{Фочфат}usAfsGafaGfCfcagG faAfgCfcGfcsUfsu	1820

D-2346	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] auggeuUfcCfAfGfAfuauGCCusu su	1821	{Фoсфaт}asGfsgCfaUfaUfcug GfaAfgccaususu	1822
D-2347	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] acauggCfuUfCfCfAfgaUfaUfg CfscsUf	1823	{Фoсфaт}asGfsgCfaUfaUfcug gaAfgCfcaugususu	1824
D-2348	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] AfcAfuGfgCfuUfcCfAfGfAfu ugcscsu	1825	{Фoсфaт}asGfsgCfaUfaUfcug GfaAfgCfcAfuGfusUfsu	1826
D-2349	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] caacguAfcCfCfUfUfcauugaug su	1827	{Фoсфaт}asCfSaUfcAfaUfGfaa ggGfuAfcguugsusu	1828
D-2350	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] caacguacCfcUfUfCfAfuUGfaU fgsUf	1829	{Фoсфaт}asCfSaUfcAfaUfGfaaG fgGfuacguugsusu	1830
D-2351	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] acguacCfcUfUfCfAfuugaugusu su	1831	{Фoсфaт}asCfSaUfcAfaUfGfaaG fgGfuacguugsusu	1832
D-2352	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucas{invAb}	1833	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	1834
D-2353	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucacsa su	1835	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	1836
D-2354	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfgCfCfUfUfucUfaCfa UfsusUf	1837	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	1838
D-2355	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucUfaCfas{inv Ab}	1839	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	1840
D-2356	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucUfaC fasUf	1841	{Фoсфaт}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	1842
D-2357	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucas{invAb}	1843	{Фoсфaт}asUfsguagAfaaggCfa Ufgaagcagsusu	1844

D-2358	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacas {invAb}	1845	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	1846
D-2359	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfgCfCfUfUfucuaucasu su	1847	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaaGfg CfaUfgaagcsusu	1848
D-2360	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] CfuUfcAfuGfcCfUfUfUfucua gususu	1849	{Φοcφar}asCfsuGfuAfGfaaagG fcAfugaagsusu	1850
D-2361	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfucacags{invAb}	1851	{Φοcφar}asCfsuGfuAfGfaaagG fcAfugaagcasusu	1852
D-2362	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacs su	1853	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaaGfg CfaUfgaagcagsusu	1854
D-2363	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuaacas{invAb}	1855	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaaggc aUfgaagcagsusu	1856
D-2364	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuaacas{invAb}	1857	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaaGfg CfaUfgaagcagsusu	1858
D-2365	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauCfcCfUfUfUfucuaagusu su	1859	{Φοcφar}asCfsuGfuAfGfaaagG fgAfugaagsusu	1860
D-2366	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfcCfCfUfUfucuaucasu su	1861	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaagg GfaUfgaagcsusu	1862
D-2367	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uCfcCfUfUfUfucacags{invAb}	1863	{Φοcφar}asCfsuGfuAfGfaaagG fgAfugaagcasusu	1864
D-2368	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfcCfCfUfUfucuaacas{invAb}	1865	{Φοcφar}asUfsgUfaGfAfaagg GfaUfgaagcagsusu	1866
D-2369	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] acauugCfuCfUfUfUfcaccugasu su	1867	{Φοcφar}usCfsaGfgUfGfaaagA fgCfaaugususu	1868
D-2370	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuaacas{invAb}	1869	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1870
D-2371	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc	1871	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc	1872

2371	aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}		asgsusu	
D- 2372	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1873	asUfsgsUfaGfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1874
D- 2373	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1875	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agusu	1876
D- 2374	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1877	asUfsgsUfaGfAfaaggCfaUfgaag cagusu	1878
D- 2375	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1879	asUfgUfaGfAfaaggCfaUfgaagca gsusu	1880
D- 2376	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1881	asUfgUfaGfAfaaggCfaUfgaagca sgsusu	1882
D- 2377	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb }	1883	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1884
D- 2378	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucascas{invA b}	1885	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1886
D- 2379	{sGalNAc3K2AhxC6}csugcuu caUfgCfCfUfUfucucacas{invAb }	1887	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1888
D- 2380	{sGalNAc3K2AhxC6}csugcu ucaUfgCfCfUfUfucucacas{invA b}	1889	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1890
D- 2381	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCf[dT]UfUfucacagu susu	1891	{Фocφar}asCfsuGfuAfGfaagG fcAfugaagsusu	1892
D- 2382	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUfUfucacagusu su	1893	{Фocφar}asCfsuGfuAfGfaaAfg GfcAfugaagsusu	1894
D- 2383	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfuUfUfucacagus u	1895	{Фocφar}asCfsuGfuAfGfaagG fcAfugaagsusu	1896
D- 2384	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUfUfucacagusu	1897	{Фocφar}asCfsuGfuaGfaagGf cAfugaagsusu	1898

	su			
D-2385	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUfUfUfcuacagusu su	1899	{Фочфат}asCfsuguaGfaaagGfc Afugaagsusu	1900
D-2386	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfc[dC]UfUfUfcuacagu susu	1901	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaaagG fcAfugaagsusu	1902
D-2387	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUf[dT]Ufcuacagu susu	1903	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaaagG fcAfugaagsusu	1904
D-2388	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfgGfGfAfUfucuausu su	1905	{Фочфат}asUfsgUfaGfAfauccC faUfgaagcsusu	1906
D-2389	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcGfAfAfUfcuacagusu su	1907	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaauc GfcAfugaagsusu	1908
D-2390	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuaas{invAb}	1909	{Фочфат}usUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1910
D-2391	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaasa sa	1911	{Фочфат}usUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1912
D-2392	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuaas{invDA }	1913	{Фочфат}usUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1914
D-2393	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgGfGfAfUfucuaas{invAb }	1915	{Фочфат}asUfsgUfaGfAfauccC faUfgaagcagsusu	1916
D-2394	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgGfGfAfUfucuaasa su	1917	{Фочфат}asUfsgUfaGfAfauccC faUfgaagcagsusu	1918
D-2395	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] CfuUfcAfuGfcCfUfUfUfcuAfc AfgUfsusUf	1919	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaaagG fcAfugaagsusu	1920
D-2396	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]	1921	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaaagG	1922

2396	cuucauGfcCfUfUfUfcuAfcAfg UfsusUf		fcAfuGfaAfgsUfsu	
D- 2397	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] gcuucaUfgCfCfUfUfucuaucasu su	1923	asUfsgUfaGfAfaagCfaUfgaagc susu	1924
D- 2398	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugcuucauGfcCfUfUfucacags {invAb}	1925	asCfsuGfuAfGfaagGfcAfugaag casusu	1926
D- 2399	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUfUfucacagusu su	1927	{Фочар}asCfsuGfuAfGfaagG fcAfuGfaAfgsUfsu	1928
D- 2400	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuAfcAfgs{inv Ab}	1929	asCfsuGfuAfGfaagGfcAfugaag casusu	1930
D- 2401	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invAb}	1931	asCfsuGfuAfGfaaAfgGfcAfuga agcasusu	1932
D- 2402	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invAb}	1933	asCfsuguaGfaagGfcAfugaagca susu	1934
D- 2403	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfUfUfucacagusu su	1935	asCfsuGfuAfGfaagGfcAfugaag susu	1936
D- 2404	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invAb}	1937	asCfsuGfuAfGfaagGfcAfugaag casusu	1938
D- 2405	{GalNAc3K2AhxC6}augccuuu CfuAfCfAfGfuggcusus{invAb }	1939	{Фочар}asGfscCfaCfUfguAfg AfaAfgGfcAfuGfasUfsu	1940
D- 2406	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfagugges{invAb }	1941	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1942
D- 2407	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] augccuUfuCfUfAfCfaguggcusu su	1943	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau susu	1944
D- 2408	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] augccuUfuCfUfAfCfagUfgGfc	1945	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau susu	1946

	UfsusUf			
D-2409	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggscsu	1947	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1948
D-2410	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfagUfgGfcs{invAb}	1949	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1950
D-2411	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUfAfCfaguggcusu	1951	asGfscCfaCfUfguAfgAfaAfggc aususu	1952
D-2412	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	1953	asGfscCfaCfUfguAfgAfaAfggc augasusu	1954
D-2413	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	1955	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcauga susu	1956
D-2414	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	1957	asGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1958
D-2415	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUfAfCfaguggcasusu	1959	usGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau susu	1960
D-2416	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	1961	usGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1962
D-2417	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggscsa	1963	usGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1964
D-2418	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invDA}	1965	usGfscCfaCfUfguagAfaAfggcau gasusu	1966
D-2419	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuas{invAb}	1967	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	1968
D-	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc	1969	usUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag	1970

2420	aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}		susu	
D- 2421	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invDA }	1971	usUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	1972
D- 2422	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb }	1973	usGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	1974
D- 2423	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invDA }	1975	usGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	1976
D- 2424	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cuucauGfcCfuUfUfucacagusu u	1977	{Фочфат}asCfsuGfuAfGfaaAfg GfcAfugaagsusu	1978
D- 2425	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1979	asUfsgUfa[Ab]AfaaggCfaUfgaa gcagsusu	1980
D- 2426	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1981	asUfsgua[Ab]AfaaggCfaUfgaag cagsusu	1982
D- 2427	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfucacags{invAb}	1983	asCfsuGfu[Ab]GfaaagGfcAfuga agcasusu	1984
D- 2428	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfucacags{invAb}	1985	asCfsugu[Ab]GfaaagGfcAfugaa gcagsusu	1986
D- 2429	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb }	1987	asGfscCfa[Ab]UfguagAfaAfggc augasusu	1988
D- 2430	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb }	1989	asGfscCa[Ab]UfguagAfaAfggca ugasusu	1990
D- 2431	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1991	asUfs[GNA- G]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1992
D- 2432	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1993	asUfsg[GNA- U]agAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1994
D- 2433	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacas{invAb}	1995	asUfsgu[GNA- A]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1996
D- 2434	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc	1997	asUfsgua[GNA-	1998

2434	aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}		G]AfaaggCfaUfgaagcagsusu	
D- 2435	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	1999	asUfsguag[GNA- A]aaggCfaUfgaagcagsusu	2000
D- 2436	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2001	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2002
D- 2437	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2003	asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagca gsusu	2004
D- 2438	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacsa su	2005	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2006
D- 2439	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacac {invAb}	2007	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2008
D- 2440	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2009	asUfsguagAfaaGfgCfaUfgaagca gsusu	2010
D- 2441	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucUfaCfas{inv Ab}	2011	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2012
D- 2442	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucUfaC fasUf	2013	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2014
D- 2443	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucUfaCfas{inv Ab}	2015	asUfsguagAfaaGfgCfaUfgaagca gsusu	2016
D- 2444	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2017	asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	2018
D- 2445	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacsa su	2019	asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	2020
D- 2446	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacac {invAb}	2021	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagc agsusu	2022
D- 2447	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2023	as[Ab]guagAfaaggCfaUfgaagca gsusu	2024

D-2448	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	2025	asUfs[Ab]uagAfaaggCfaUfgaag cagsusu	2026
D-2449	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	2027	asUfsg[Ab]agAfaaggCfaUfgaag cagsusu	2028
D-2450	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	2029	asUfsgu[Ab]gAfaaggCfaUfgaag cagsusu	2030
D-2451	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	2031	asUfsguag[Ab]aaggCfaUfgaagc agsusu	2032
D-2452	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	2033	asUfsguagAf[Ab]aggCfaUfgaag cagsusu	2034
D-2453	{sGalNAc3K2AhxC6}caacgua cCfcUfUfCfAfuugaugs{invAb }	2035	asCfsaucaAfugaaGfgGfuacguu susu	2036
D-2454	{sGalNAc3K2AhxC6}caacgua cCfcUfUfCfAfuugaugs{invAb }	2037	asCfsaUfcAfAfugaaGfgGfuacgu ugsusu	2038
D-2455	{sGalNAc3K2AhxC6}acauggc uUfcCfAfGfAfuugaugs{invAb }	2039	asGfsgcauAfucugGfaAfgccaugu susu	2040
D-2456	{sGalNAc3K2AhxC6}acauggc uUfcCfAfGfAfuugaugs{invAb }	2041	asGfsgCfaUfAfucugGfaAfgcca gususu	2042
D-2457	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	2043	asUfsguaGfAfaaggCfaUfgaagca gsusu	2044
D-2458	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucUfacas{invA b}	2045	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2046
D-2459	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuaCfas{invA b}	2047	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2048
D-2460	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcggc uUfcCfUfGfGfgcuucus{invAb }	2049	usAfsgAfaGfCfccagGfaAfgccgc agsusu	2050
D-	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcggc	2051	usAfsgaagCfccagGfaAfgccgcag	2052

2461	uUfcCfUfGfGfGfcuucus{invAb}		susu	
D-2462	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invAb}	2053	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagc asusu	2054
D-2463	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags su	2055	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagc asusu	2056
D-2464	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags {invAb}	2057	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagc asusu	2058
D-2465	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invAb}	2059	asCfsuGfuaGfaaAfgGfcAfugaag casusu	2060
D-2466	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuAfcAfgs{inv Ab}	2061	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagc asusu	2062
D-2467	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuAfcAfgs{inv Ab}	2063	asCfsuGfuAfgfaaagGfcAfuGfa AfgCfasUfsu	2064
D-2468	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu CfaUfGfCfcuuucuasasu	2065	asUfsguaGfaaAfggcaUfgAfagca gsusu	2066
D-2469	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu CfaUfGfCfcuuucuasasu	2067	asUfsguaGfaaaggcaUfgAfagcag susu	2068
D-2470	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu CfaUfGfCfcuuucuasasu	2069	asUfsguaGfaAfAfggcaUfgAfag cagsusu	2070
D-2471	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invAb}	2071	usCfsuguaGfaaagGfcAfugaagca susu	2072
D-2472	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfcuacags{invDA }	2073	usCfsuguaGfaaagGfcAfugaagca susu	2074
D-2473	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuas{invDT }	2075	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2076
D-2474	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuas{invAb}	2077	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2078

D-2475	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucac{invAb}	2079	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2080
D-2476	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucac{invAb}	2081	asUfsguagAfs[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2082
D-2477	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2083	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2084
D-2478	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2085	asUfsguagAf[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2086
D-2479	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2087	asUfsguaga[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2088
D-2480	csusgcuucaUfgCfCfUfucua s{invAb}	2089	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2090
D-2481	csusgcuucaUfgCfCfUfucua s{invAb}	2091	asUfsguaga[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2092
D-2482	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2093	asUfsguaga[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2094
D-2483	csusgcuucaUfgCfCfUfucua s{invAb}	2095	asUfsguagAf[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2096
D-2484	csusgcuucaUfgCfCfUfucua s{invAb}	2097	asUfsguaga[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2098
D-2485	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2099	asUfsgUfaGfAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2100
D-2486	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2101	asUfsgUfagAf[GNA- A]aGfgCfaUfgaagcagsusu	2102
D-2487	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2103	asUfsgUfagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2104
D-2488	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2105	asUfsgUfaGfAf[GNA- A]aGfgCfaUfgaagcagsusu	2106
D-2489	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2107	asUfsguagAf[GNA- A]aGfgCfaUfgaagcagsusu	2108
D-2490	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucUfa Cfas{invAb}	2109	asUfsguagAf[GNA- A]aGfgCfaUfgaagcagsusu	2110
D-2491	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2111	asUfsguagAf[GNA- A]a[dG]gCfaUfgaagcagsusu	2112

D-2492	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2113	asUfsguagAf[GNA- A][dA]ggCfaUfgaagcagsusu	2114
D-2493	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2115	asUfsguagAf[GNA- A]ag[dG]CfaUfgaagcagsusu	2116
D-2494	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2117	asUfsguaGfAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2118
D-2495	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2119	asUfsguaGfa[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2120
D-2496	csusgcuucaUfgCfCfUfUfucua as{invAb}	2121	asUfsguaGfa[GNA- A]AfgCfaUfgaagcagsusu	2122
D-2497	csusgcuuCfaUfGfCfcuuucua s{invAb}	2123	asUfsguaGfa[GNA- A]aggcaUfgAfgcagsusu	2124
D-2498	csusgcuuCfaUfGfCfcuuucua s{invAb}	2125	asUfsguaGfa[GNA- A]AfggcaUfgAfgcagsusu	2126
D-2499	csusgcuuCfaUfgCfcuuucua s{invAb}	2127	asUfsguaga[GNA- A]aggCfaUfgAfgcagsusu	2128
D-2500	csusgcuuCfaUfgCfcuuucua s{invAb}	2129	asUfsguagaaggCfaUfgAfgcag susu	2130
D-2501	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2131	us[sGNA- C]uguaGfaagGfcAfugaagcasu u	2132
D-2502	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2133	usCfs[GNA- U]guaGfaagGfcAfugaagcasusu	2134
D-2503	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2135	usCfsug[GNA- U]aGfaagGfcAfugaagcasusu	2136
D-2504	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2137	usCfsugu[GNA- A]GfaagGfcAfugaagcasusu	2138
D-2505	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2139	usCfsuguaGf[GNA- A]aagGfcAfugaagcasusu	2140
D-2506	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2141	us[Ab]uguaGfaagGfcAfugaagc asusu	2142
D-2507	usgsuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2143	usCfs[Ab]guaGfaagGfcAfugaa gcasusu	2144
D-2508	usgsuucauGfcCfUfUfucua	2145	usCfsu[Ab]uaGfaagGfcAfugaa	2146

2508	gs{invDA}		gcasusu	
D-2509	usgscuucGfcCfUfUfUfcuaca gs{invDA}	2147	usCfsug[Ab]aGfaagGfcAfugaa gcasusu	2148
D-2510	usgscuucGfcCfUfUfUfcuaca gs{invDA}	2149	usCfsugu[Ab]GfaagGfcAfugaa gcasusu	2150
D-2511	usgscuucGfcCfUfUfUfcuaca gs{invDA}	2151	usCfsugua[Ab]aaagGfcAfugaag casusu	2152
D-2512	usgscuucGfcCfUfUfUfcuaca gs{invDA}	2153	usCfsuguaGf[Ab]aagGfcAfugaa gcasusu	2154
D-2513	uscscugccuUfuCfUfAfCfagugg cs{invDT}	2155	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	2156
D-2514	uscscugccuUfuCfUfAfCfagugg cs{invAb}	2157	usGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	2158
D-2515	uscscugccuUfuCfUfAfCfagugg cs{invDA}	2159	usGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	2160
D-2516	uscscugccuUfuCfUfAfCfagugg as{invDT}	2161	asUfsagaaAfggcaUfgAfgcagga susu	2162
D-2517	uscscugccuUfuCfUfAfCfagugg as{invAb}	2163	usUfsagaaAfggcaUfgAfgcagga susu	2164
D-2518	uscscugccuUfuCfUfAfCfagugg as{invDA}	2165	usUfsagaaAfggcaUfgAfgcagga susu	2166
D-2519	usasuguuccUfgCfUfUfCfaugcc us{invDT}	2167	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacaua susu	2168
D-2520	usasuguuccUfgCfUfUfCfaugcc us{invAb}	2169	usAfsggcaUfgaagCfaGfgaacaua susu	2170
D-2521	usasuguuccUfgCfUfUfCfaugcc us{invDA}	2171	usAfsggcaUfgaagCfaGfgaacaua susu	2172
D-2522	{sGalNAc3K2AhxC6}uccugcu uCfaUfGfCfCfuucuas{invAb}	2173	asUfsagaaAfggcaUfgAfgcagga susu	2174
D-2523	{sGalNAc3K2AhxC6}uauguuc cUfgCfUfUfCfaugccs{invAb}	2175	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacaua susu	2176
D-2524	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invDT }	2177	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	2178

D-2525	{sGalNAc3K2AhxC6}uccugcu uCfaUfGfCfCfuuuucas{invDT }	2179	asUfsagaaAfggcaUfgAfagcagga susu	2180
D-2526	{sGalNAc3K2AhxC6}uccugcu uCfaUfGfCfCfuuuucas{invDA }	2181	usUfsagaaAfggcaUfgAfagcagga susu	2182
D-2527	{sGalNAc3K2AhxC6}uauuguuc cUfgCfUfUfCfaugccus{invDA }	2183	usAfsggcaUfgaagCfaGfgaacaua susu	2184
D-2528	usgscuucauGfcCfUfUfucua gs{invDA}	2185	usCfsugua[GNA- G]aaagGfcAfugaagcasusu	2186
D-2529	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2187	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2188
D-2530	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2189	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2190
D-2531	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuac as{invAb}	2191	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2192
D-2532	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2193	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2194
D-2533	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuac as{invAb}	2195	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2196
D-2534	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2197	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2198
D-2535	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuac as{invAb}	2199	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2200
D-2536	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2201	asUfsguagAfs[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2202
D-2537	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2203	asUfsguagAfs[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2204
D-2538	cugcuucaUfgCfCfUf[LNA- T]ucuacas{invAb}	2205	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2206
D-2539	cugcuucaUfgCfCf[LNA- T]Ufucuacas{invAb}	2207	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2208
D-	cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA-	2209	asUfsguagAf[GNA-	2210

2540	T]cuacas{invAb}		A]aggCfaUfgaagcagsusu	
D-2541	cugcuucaUfgCfCfUfUfuc[LNA-T]acas{invAb}	2211	asUfsgu[GNA-A]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2212
D-2542	cugcuucaUfgCfCfUfUfuc[LNA-A-A]cas{invAb}	2213	asUfsg[GNA-U]agAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2214
D-2543	cugcuucaUfgCfCfUfUfucac[sLNA-A]{invAb}	2215	as[sGNA-U]guagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2216
D-2544	cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA-T]cuacas{invAb}	2217	asUfsguag[Ab]aaggCfaUfgaagcagsusu	2218
D-2545	cugcuucaUfgCfCfUfUfuc[LNA-T]acas{invAb}	2219	asUfsgu[Ab]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2220
D-2546	cugcuucaUfgCfCfUfUfuc[LNA-A-A]cas{invAb}	2221	asUfsg[Ab]agAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2222
D-2547	cugcuucaUfgCfCfUfUfucUfaCfas{invAb}	2223	asUfsgUfagAf[GNA-A]aggCfaUfgaagcagsusu	2224
D-2548	cugcuucaUfgCfCfUfUfucUfaCfas{invAb}	2225	asUfsguagAf[GNA-A]aggCfaUfgaagcagsusu	2226
D-2549	cugcuucaUfgCfCfUfs[LNA-T]jucucas{invAb}	2227	asUfsguagAf[GNA-A]aggCfaUfgaagcagsusu	2228
D-2550	cugcuucaUfgCfCfUfs[sLNA-T]jucucas{invAb}	2229	asUfsguagAf[GNA-A]aggCfaUfgaagcagsusu	2230
D-2551	cugcuucaUfgCfCfUf[LNA-T]jucucas{invAb}	2231	asUfsguagAf[sGNA-A]aggCfaUfgaagcagsusu	2232
D-2552	cugcuucaUfgCfCfUf[LNA-T]jucucas{invAb}	2233	asUfsguagAfs[GNA-A]aggCfaUfgaagcagsusu	2234
D-2553	usgscuucauGfcCfUfUfUfcu[LNA-A]cags{invDA}	2235	usCfsug[Ab]aGfaaagGfcAfugaa gcasusu	2236
D-2554	usgscuucauGfcCfUfUfUfc[LNA-A-T]acags{invDA}	2237	usCfsugu[Ab]GfaaagGfcAfugaa gcasusu	2238
D-2555	usgscuucauGfcCfUfUf[LNA-T]cuacags{invDA}	2239	usCfsuguaGf[Ab]aagGfcAfugaa gcasusu	2240
D-2556	usgscuucauGfcCfUfUfUfcuac[LNA-A]gs{invDA}	2241	usCfs[GNA-U]guaGfaaagGfcAfugaagcasusu	2242

D-2557	usgscuucauGfcCfUfUfUfcu[LNA-A]cags{invDA}	2243	usCfsug[GNA-U]aGfaagGfcAfugaagcasusu	2244
D-2558	usgscuucauGfcCfUfUfUfc[LN A-T]acags{invDA}	2245	usCfsugu[GNA-A]GfaagGfcAfugaagcasusu	2246
D-2559	usgscuucauGfcCfUfUfUfcuaca[sLNA-G]{invDA}	2247	us[Ab]uguaGfaagGfcAfugaagcasusu	2248
D-2560	usgscuucauGfcCfUfUfUfcuac[LNA-A]gs{invDA}	2249	usCfs[Ab]guaGfaagGfcAfugaagcasusu	2250
D-2561	ucaugccuUfuCfUfAfCfa[LNA-G]jggcs{invAb}	2251	asGfscca[Ab]UfugaAfaAfggcaugasusu	2252
D-2562	ucaugccuUfuCfUfAfCfag[LNA-T]jggcs{invAb}	2253	asGfscca[Ab]UfugaAfaAfggcaugasusu	2254
D-2563	ucaugccuUfuCfUfAfCfasgsuggcs{invAb}	2255	asGfscca[Ab]UfugaAfaAfggcaugasusu	2256
D-2564	{GalNAc3K2AhxC6}GfgUfaUfgUfuCfCfUfGfcUfcAfuUfsusuUf	2349	{Φocφar}asAfsuGfaAfGfcaggAfaCfaUfaCfcsUfsu	2350
D-2565	{GalNAc3K2AhxC6}GfgUfaUfgUfuCfCfUfGfcUfcAfuAfsusuUf	2351	{Φocφar}usAfsuGfaAfGfcaggAfaCfaUfaCfcsUfsu	2352
D-2566	{GalNAc3K2AhxC6}GfuAfuGfuUfcCfUfGfCfuUfcfaUfgUfsusuUf	2353	{Φocφar}asCfsaUfgAfaAfgcaggGfaAfcAfuAfcUfsu	2354
D-2567	{GalNAc3K2AhxC6}UfaUfgUfuCfcUfGfCfUfucAfuGfcAfsusuUf	2355	{Φocφar}usGfscAfuGfAfaGcaGfgAfaCfaUfasUfsu	2356
D-2568	{GalNAc3K2AhxC6}AfuGfuUfcCfuGfCfUfUfcaUfgCfcUfsusuUf	2357	{Φocφar}asGfsgCfaUfGfaagCfaGfaAfcAfusUfsu	2358
D-2569	{GalNAc3K2AhxC6}UfgUfuCfcUfgCfUfUfcaUfgCfcUfsusuUf	2359	{Φocφar}asAfsGfCfaUfGfaagCfaGfgAfaCfasUfsu	2360
D-2570	{GalNAc3K2AhxC6}GfuUfcCfuGfcUfUfCfAfugCfcUfuUfsusu	2361	{Φocφar}asAfsaGfgCfAfugaagCfaAfgGfaAfcUfsu	2362

	sUf			
D-2571	{GalNAc3K2AhxC6}UfuCfcUfgCfuUfCfAfUfgcCfuUfuUfsusUf	2363	{Фочар}asAfsaAfgGfCfaugaAfgCfaGfgAfasUfsu	2364
D-2572	{GalNAc3K2AhxC6}UfuCfcUfgCfuUfCfAfUfgcCfuUfuAfsusUf	2365	{Фочар}usAfsaAfgGfCfaugaAfgCfaGfgAfasUfsu	2366
D-2573	{GalNAc3K2AhxC6}UfcCfuGfcUfuCfAfUfGfccUfuUfcUfsusUf	2367	{Фочар}asGfsaAfaGfGfcaugaAfaGfcAfgGfasUfsu	2368
D-2574	{GalNAc3K2AhxC6}CfcUfgCfuUfcAfUfGfCfcuUfuCfuAfsusUf	2369	{Фочар}usAfsaAfaGfGfgcauGfaAfgCfaGfgsUfsu	2370
D-2575	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcUfuCfaUfGfCfCfuUfcUfaUfsusUf	2371	{Фочар}asUfsaGfaAfAfggcaUfgAfaGfcAfgsUfsu	2372
D-2576	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcUfuCfaUfGfCfCfuUfcUfaAfsusUf	2373	{Фочар}usUfsaGfaAfAfggcaUfgAfaGfcAfgsUfsu	2374
D-2577	{GalNAc3K2AhxC6}UfgCfuUfcAfuGfCfUfuUfcUfaAfsusUf	2375	{Фочар}usGfsuAfgAfAfaaggAfuGfaAfgCfasUfsu	2376
D-2578	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucUfaCfaUfsusUf	2377	{Фочар}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcsUfsu	2378
D-2579	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucUfaCfaAfsusUf	2379	{Фочар}usUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgAfaGfcsUfsu	2380
D-2580	{GalNAc3K2AhxC6}CfuUfcAfuGfcCfUfUfucUfaAfgUfsusUf	2381	{Фочар}asCfsuGfuAfGfaaagGfcAfuGfaAfgsUfsu	2382
D-2581	{GalNAc3K2AhxC6}UfuCfaUfgCfcUfUfCfuaCfaGfuUfsusUf	2383	{Фочар}asAfsuUfgUfAfgaaaGfgCfaUfgAfasUfsu	2384

D-2582	{GalNAc3K2AhxC6}UfuCfaUfgCfcUfUfCfuaCfaGfuAfsusUf	2385	{Φοϕαρ}usApscUfgUfAfgaaaGfgCfaUfgAfasUfsu	2386
D-2583	{GalNAc3K2AhxC6}UfcAfuGfcCfuUfUfCfUfacAfgUfgUfsusUf	2387	{Φοϕαρ}asCfsaCfuGfUfagaaAfgGfcAfuGfasUfsu	2388
D-2584	{GalNAc3K2AhxC6}UfcAfuGfcCfuUfUfCfUfacAfgUfgAfsusUf	2389	{Φοϕαρ}usCfsaCfuGfUfagaaAfgGfcAfuGfasUfsu	2390
D-2585	{GalNAc3K2AhxC6}CfaUfgCfcUfuUfCfUfAfaGfuGfgUfsusUf	2391	{Φοϕαρ}asCfscAfcUfGfuagaAfaGfgCfaUfgsUfsu	2392
D-2586	{GalNAc3K2AhxC6}CfaUfgCfcUfuUfCfUfAfaGfuGfgAfsusUf	2393	{Φοϕαρ}usCfscAfcUfGfuagaAfaGfgCfaUfgsUfsu	2394
D-2587	{GalNAc3K2AhxC6}AfuGfcCfuUfuCfUfAfcfagUfgGfcUfsusUf	2395	{Φοϕαρ}asGfscCfaCfUfaguagaAfaAfgGfcAfusUfsu	2396
D-2588	{GalNAc3K2AhxC6}AfuGfcCfuUfuCfUfAfcfagUfgGfcAfsusUf	2397	{Φοϕαρ}usGfscCfaCfUfaguagaAfaAfgGfcAfusUfsu	2398
D-2589	{GalNAc3K2AhxC6}UfgCfcUfuUfcUfAfcfAfgUfgCfcUfsusUf	2399	{Φοϕαρ}asGfsgCfcAfcfuguaGfaAfaGfgCfasUfsu	2400
D-2590	{GalNAc3K2AhxC6}GfcCfuUfuCfuAfcfAfgUfgCfcUfsusUf	2401	{Φοϕαρ}asAfgGfcCfAfcuguAfgAfaAfgGfcsUfsu	2402
D-2591	{GalNAc3K2AhxC6}GfgUfaUfgUfuCfCfUfGfcUfcAfuCfsusUf	2403	{Φοϕαρ}gsAfsuGfaAfGfcaggAfaCfaUfaCfesUfsu	2404
D-2592	{GalNAc3K2AhxC6}GfuAfuGfuUfcCfUfGfCfuCfaUfcCfsusUf	2405	{Φοϕαρ}gsGfsaUfgAfAfgcaggfaAfcAfuAfcUfsu	2406
D-	{GalNAc3K2AhxC6}UfaUfgU	2407	{Φοϕαρ}gsGfsgAfuGfAfgca	2408

2593	fuCfcUfGfCfUfucAfuCfcCfsus Uf		GfgAfaCfaUfasUfsu	
D- 2594	{GalNAc3K2AhxC6}AfuGfuU fcCfuGfCfUfUfcaUfcCfcCfsus Uf	2409	{Φocφar}gsGfsgGfaUfGfaagc AfgGfaAfcAfusUfsu	2410
D- 2595	{GalNAc3K2AhxC6}UfgUfuC fcUfgCfUfUfCfauCfcCfcUfsus Uf	2411	{Φocφar}asGfsgGfgAfUfgaag CfaGfgAfaCfasUfsu	2412
D- 2596	{GalNAc3K2AhxC6}GfuUfcC fuGfcUfUfCfAfuCfcCfuUfsus Uf	2413	{Φocφar}asAfsGfgGfAfugaa GfcAfgGfaAfcUfsu	2414
D- 2597	{GalNAc3K2AhxC6}UfuCfcU fgCfuUfCfAfUfccCfcUfuCfsus Uf	2415	{Φocφar}gsAfsaGfgGfGfauga AfgCfaGfgAfasUfsu	2416
D- 2598	{GalNAc3K2AhxC6}UfcCfuG fcUfuCfAfUfCfccCfuUfcUfsus Uf	2417	{Φocφar}asGfsaAfgGfGfgaug AfaGfcAfgGfasUfsu	2418
D- 2599	{GalNAc3K2AhxC6}CfcUfgC fuUfcAfUfCfCfccUfuCfuAfsus Uf	2419	{Φocφar}usAfsGafaGfGfggau GfaAfgCfaGfgsUfsu	2420
D- 2600	{GalNAc3K2AhxC6}CfuGfcU fuCfaUfCfCfCfcuUfcUfaCfsus Uf	2421	{Φocφar}gsUfsaGfaAfGfggga UfgAfaGfcAfgsUfsu	2422
D- 2601	{GalNAc3K2AhxC6}UfgCfuU fcAfuCfCfCfCfuCfuAfcAfsus Uf	2423	{Φocφar}usGfsuAfgAfAfgggg AfuGfaAfgCfasUfsu	2424
D- 2602	{GalNAc3K2AhxC6}GfcUfuC faUfcCfCfCfUfucUfaCfaGfsus Uf	2425	{Φocφar}csUfsgUfaGfAfgggg GfaUfgAfaGfcsUfsu	2426
D- 2603	{GalNAc3K2AhxC6}CfuUfcA fuCfcCfCfUfUfcuAfcAfgUfsus Uf	2427	{Φocφar}asCfsuGfuAfGfaagg GfgAfuGfaAfgsUfsu	2428
D- 2604	{GalNAc3K2AhxC6}UfuCfaU fcCfcCfUfUfCfuaCfaGfuGfsus	2429	{Φocφar}csAfsUfgUfAfgaag GfgGfaUfgAfasUfsu	2430

	Uf			
D-2605	{GalNAc3K2AhxC6}UfcAfuCfcCfcUfUfCfUfacAfgUfgGfsusUf	2431	{Φocφar}csCfsaCfuGfUfagaaGfgGfgAfuGfasUfsu	2432
D-2606	{GalNAc3K2AhxC6}CfaUfcCfcCfuUfCfUfAfaGfuGfgCfsusUf	2433	{Φocφar}gsCfscAfcUfGfuagaAfgGfgGfaUfgsUfsu	2434
D-2607	{GalNAc3K2AhxC6}AfuCfcCfcUfuCfUfAfcfagUfgGfcCfsusUf	2435	{Φocφar}gsGfscCfaCfUfguagaAfaGfgGfgAfusUfsu	2436
D-2608	{GalNAc3K2AhxC6}UfcCfcCfuUfcUfAfcfAfgUfgGfcUfsusUf	2437	{Φocφar}asGfsgCfcAfcfugaGfaAfgGfgGfasUfsu	2438
D-2609	{GalNAc3K2AhxC6}CfcCfcUfuCfuAfcfAfgUfgGfcCfuUfsusUf	2439	{Φocφar}asAfsGfcCfAfcuguAfgAfaGfgGfgsUfsu	2440
D-2610	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua[LNA-mC]as{invAb}	2805	asUfs[GNA-G]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2806
D-2611	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua[LNA-mC]as{invAb}	2807	asUfs[Ab]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2808
D-2612	usgscuucAUfgCfCfUfUfucua[LNA-mC]ags{invDA}	2809	usCfsu[Ab]uaGfaaagGfcAfugaa gcasusu	2810
D-2613	usgscuucAUfgCfCfUfUfucua[LNA-mC]ags{invDA}	2811	usCfsu[GNA-G]uaGfaaagGfcAfugaagcasusu	2812
D-2614	ucaugccuUfuCfUfAfcfagsuggcs{invAb}	2813	asGfscCa[Ab]UfguagAfaAfggcaugasusu	2814
D-2615	ucaugccuUfuCfUfAfcfagsuggcs{invAb}	2815	asGfscCa[Ab]UfguagAfaAfggcaugasusu	2816
D-2616	ucaugccuUfuCfUfAfcfas[LNA-G]uggcs{invAb}	2817	asGfscCa[Ab]UfguagAfaAfggcaugasusu	2818
D-2617	ucaugccuUfuCfUfAfcfas[sLNA-G]uggcs{invAb}	2819	asGfscCa[Ab]UfguagAfaAfggcaugasusu	2820
D-2618	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucas{invAb}	2821	as[sMeO-I]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2822

D-2619	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2823	asUfsg[MeO- I]jagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2824
D-2620	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2825	asUfsgu[MeO- I]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2826
D-2621	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2827	asUfsgua[MeO- I]AfaaggCfaUfgaagcagsusu	2828
D-2622	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2829	asUfsguagAf[MeO- I]jaggCfaUfgaagcagsusu	2830
D-2623	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacs {invAb}	2831	as[sMeO- I]guagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2832
D-2624	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuccas {invAb}	2833	asUfsg[MeO- I]jagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2834
D-2625	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2835	asUfsguag[MeO- I]jaaggCfaUfgaagcagsusu	2836
D-2626	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2837	asUfsguagAf[MeO- I]jaggCfaUfgaagcagsusu	2838
D-2627	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacus {invAb}	2839	asAfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2840
D-2628	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2841	asUfsgaagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2842
D-2629	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacas {invAb}	2843	asUfsguugAfaaggCfaUfgaagcag susu	2844
D-2630	cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacas {invAb}	2845	asUfsguagAfuaggCfaUfgaagcag susu	2846
D-2631	ugcuucauGfcCfUfUfucucacs {invAb}	2847	as[sMeO- I]juaGfaagGfcAfugaagcasusu	2848
D-2632	ugcuucauGfcCfUfUfucucacags {invAb}	2849	asCfs[MeO- I]guaGfaagGfcAfugaagcasusu	2850
D-2633	ugcuucauGfcCfUfUfucucacags {invAb}	2851	asCfsug[MeO- I]aGfaagGfcAfugaagcasusu	2852
D-2634	ugcuucauGfcCfUfUfucucacags {invAb}	2853	asCfsugu[MeO- I]GfaagGfcAfugaagcasusu	2854
D-2635	ugcuucauGfcCfUfUfucucacags {invAb}	2855	asCfsugua[MeO- I]jaaagGfcAfugaagcasusu	2856

D-2636	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuaccgs {invAb}	2857	asCfs[MeO- I]guaGfaagGfcAfugaagcasusu	2858
D-2637	ugcuucauGfcCfUfUfUfuccags {invAb}	2859	asCfsug[MeO- I]aGfaagGfcAfugaagcasusu	2860
D-2638	ugcuucauGfcCfUfUfUfccacags {invAb}	2861	asCfsugu[MeO- I]GfaagGfcAfugaagcasusu	2862
D-2639	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaaas {invAb}	2863	asUfsuuagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2864
D-2640	cugcuucaUfgCfCfUfUfuauacas {invAb}	2865	asUfsguauAfaaggCfaUfgaagcag susu	2866
D-2641	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaa s{invAb}	2867	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2868
D-2642	cugcuucaUfgCfCfUf[LNA- T]ucuacas{invAb}	2869	asUfsguagAfs[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2870
D-2643	usgscuucauGfcCfUfUfUfcuaca [sLNA-G]{invDA}	2871	us[sGNA- C]uguaGfaagGfcAfugaagcasu u	2872
D-2644	usgscuucauGfcCfUfUf[LNA- T]cuacags{invDA}	2873	usCfsuguaGf[GNA- A]aagGfcAfugaagcasusu	2874
D-2645	ucaugccuUfuCfUfAfCf[LNA- A]guggcs{invAb}	2875	asGfscca[Ab]UfguagAfaAfggca ugasusu	2876
D-2646	cugcuucaUfgCfCfUfUfu[LNA- mC]uacas{invAb}	2877	asUfsgua[Ab]AfaaggCfaUfgaag cagsusu	2878
D-2647	ucaugccuUfuCfUfAfCfa[sLNA -G]uggcs{invAb}	2879	asGfscca[Ab]UfguagAfaAfggca ugasusu	2880
D-2648	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaacas {invAb}	2881	asUfs[MeO- I]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2882
D-2649	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaagas {invAb}	2883	asUfscuagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2884
D-2650	cugcuucaUfgCfCfUfUfacuacas {invAb}	2885	asUfsguagUfaaggCfaUfgaagcag susu	2886
D-2651	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags {invAb}	2887	asCfsu[MeO- I]uaGfaagGfcAfugaagcasusu	2888
D-	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags	2889	asCfsuguaGf[MeO-	2890

2652	{invAb}		I]aagGfcAfugaagcasusu	
D-2653	ugcuucauGfcCfUfUfCfcuacags {invAb}	2891	asCfsuguaGf[MeO- I]aagGfcAfugaagcasusu	2892
D-2654	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaas {invAb}	2893	asUfsauagAfaaggCfaUfgaagcag susu	2894
D-2655	cugcuucaUfgCfCfUfUfuuuacas {invAb}	2895	asUfsguaaAfaaggCfaUfgaagcag susu	2896
D-2656	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaas {invAb}	2897	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2898
D-2657	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuaca s{invAb}	2899	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2900
D-2658	cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA- T]cuacas{invAb}	2901	asUfsguag[GNA- A]aaggCfaUfgaagcagsusu	2902
D-2659	cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA- T]juacas{invAb}	2903	asUfsguagAf[Ab]aggCfaUfgaag cagsusu	2904
D-2660	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua[s LNA-A]{invAb}	2905	as[sAb]guagAfaaggCfaUfgaagc agsusu	2906
D-2661	cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA- mC]uacas{invAb}	2907	asUfsgua[GNA- G]AfaaggCfaUfgaagcagsusu	2908
D-2662	usgsuucuuGfcCfUfUfUf[LNA -mC]uacags{invDA}	2909	usCfsugua[Ab]aagGfcAfugaag casusu	2910
D-2663	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuaas {invAb}	2911	asUfsguag[MeO- I]aaggCfaUfgaagcagsusu	2912
D-2664	cugcuucaUfgCfCfUfUfsucuac as{invAb}	2913	asUfsguagAfs[sGNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2914
D-2665	cugcuucaUfgCfCfUfUf[sLNA- T]juacas{invAb}	2915	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2916
D-2666	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu caUfgCfCfUfUfucUfaCfas{inv Ab}	2917	asUfsguagAf[GNA- A]aGfCfaUfgaagcagsusu	2918
D-2667	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu CfaUfGfCfCfuuuuacuas{invAb }	2919	asUfsgUfaGfa[GNA- A]aggcaUfgAfagcagsusu	2920
D-	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu	2921	asUfsgUfaGfa[GNA-	2922

2668	CfaUfGfCfCfuuuuacuas{invAb}		A]AfggcaUfgAfgcagsusu	
D-2669	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuu CfaUfgCfuuuacuas{invAb}	2923	asUfsguaga[GNA- A]aggCfaUfgAfgcagsusu	2924
D-2670	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfuuuacuas{invAb}	2925	asUfsguagAf[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2926
D-2671	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfuuuacuas{invAb}	2927	asUfsguaga[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2928
D-2672	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUf[LNA- T]juuacuas{invAb}	2929	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcagsusu	2930
D-2673	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucua[LNA- mC]as{invAb}	2931	asUfs[GNA- G]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2932
D-2674	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfa[LNA- G]juggcs{invAb}	2933	asGfscca[Ab]UfguagAfaAfggca ugasusu	2934
D-2675	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgGfGfAfUfucuuacuas{invAb}	2935	asUfsguagAfauccCfaUfgaagcag susu	2936
D-2676	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuuacuas{invAb}	2937	asUfsguaGfa[GNA- A]AfggCfaUfgaagcagsusu	2938
D-2677	{sGalNAc3K2AhxC6}guauguu cCfuGfCfUfUfcaugccs{invAb}	2939	asGfsgcauGfaagcAfgGfaacuuac susu	2940
D-2678	{sGalNAc3K2AhxC6}uguccug cUfuCfAfUfgfcccuuucs{invAb}	2941	asGfsaaagGfcaugAfaGfcaggaca susu	2942
D-2679	{sGalNAc3K2AhxC6}gcuucau gCfCfUfUfCfuacagus{invAb}	2943	asAfcuguaAfgaaaGfgCfaugaagc susu	2944
D-2680	{sGalNAc3K2AhxC6}cuucaug cCfuUfUfCfUfacagugs{invAb}	2945	asCfsacugUfagaaAfgGfcaugaag susu	2946
D-2681	{sGalNAc3K2AhxC6}uucaugc cUfuUfCfUfAfcaguggs{invAb}	2947	asCfscacuGfuagaAfaGfgcaugaa susu	2948

D-2682	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucacac{invAb}	2949	asUfsguugAfaaggCfaUfgaagcag susu	2950
D-2683	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucuccas{invAb}	2951	asUfsg[MeO- I]agAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2952
D-2684	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfucuccags{invAb}	2953	asCfsug[MeO- I]aGfaagGfcAfugaagcasusu	2954
D-2685	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2955	asUfsgu[MeO- I]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2956
D-2686	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfucacags{invAb}	2957	asCfsugu[MeO- I]GfaagGfcAfugaagcasusu	2958
D-2687	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2959	asUfsgua[MeO- I]AfaaggCfaUfgaagcagsusu	2960
D-2688	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuuca uGfcCfUfUfUfucacags{invAb}	2961	asCfsugua[MeO- I]aaagGfcAfugaagcasusu	2962
D-2689	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2963	asUfsguag[MeO- I]aagCfaUfgaagcagsusu	2964
D-2690	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfucucacac{invAb}	2965	asUfsguagAf[MeO- I]aggCfaUfgaagcagsusu	2966
D-2691	{sGalNAc3K2AhxC6}usgscuu cauGfcCfUfUfUfuc[LNA- A]cags{invDA}	2967	usCfsug[Ab]aGfaagGfcAfugaa gcasusu	2968
D-2692	{sGalNAc3K2AhxC6}usgscuu cauGfcCfUfUfUfucac[LNA- A]gs{invDA}	2969	usCfs[GNA- U]guaGfaagGfcAfugaagcasusu	2970
D-2693	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfasgsuggcs{invA b}	2971	asGfscca[Ab]UfguagAfaAfggca ugasusu	2972
D-2694	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfuc[LNA- T]jacas{invAb}	2973	asUfsgu[GNA- A]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2974
D-2695	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuc aUfgCfCfUfUfuc[LNA- T]jacas{invAb}	2975	asUfsgu[Ab]gAfaaggCfaUfgaag cagsusu	2976
D-2697	{sGalNAc3K2AhxC6}usgscuu	2977	usCfsugu[GNA-	2978

2696	cauGfcCfUfUfUfc[LNA-T]jacags {invDA}		A]GfaaagGfcAfugaagcasusu	
D-2697	{sGalNAc3K2AhxC6}usgsuucauGfcCfUfUfUfcua[LNA-mC]ags {invDA}	2979	usCfsu[GNA-G]uaGfaaagGfcAfugaagcasusu	2980
D-2698	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfas[sLNA-G]ugges {invAb}	2981	asGfscca[Ab]UfguagAfaAfggcaugasusu	2982
D-2699	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacac {invAb}	2983	asUfs[MeO-I]uagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2984
D-2700	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacac {invAb}	2985	asUfsguag[MeO-I]aaggCfaUfgaagcagsusu	2986
D-2701	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacac {invAb}	2987	asUfsguagUfaaggCfaUfgaagcagsusu	2988
D-2702	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuucauGfcCfUfUfUfcucacags {invAb}	2989	asCfsuguaGf[MeO-I]aagGfcAfugaagcasusu	2990
D-2703	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuucauGfcCfUfUfUfcucacags {invAb}	2991	asCfsuguaGf[MeO-I]aagGfcAfugaagcasusu	2992
D-2704	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuucauGfcCfUfUfUfcucacags {invAb}	2993	asCfsu[MeO-I]uaGfaaagGfcAfugaagcasusu	2994
D-2705	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacacac {invAb}	2995	asUfsgu[MeO-I]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2996
D-2706	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacacac {invAb}	2997	asUfsgu[MeO-I]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	2998
D-2707	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacacac {invAb}	2999	asUfsgu[MeO-I]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	3000
D-2708	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucucacacac {invAb}	3001	asUfsguag[MeO-I]aaggCfaUfgaagcagsusu	3002
D-2709	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfa[sLNA-	3003	asGfscca[Ab]UfguagAfaAfggcaugasusu	3004

	G]uggcs{invAb}			
D-2710	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfcf[LNA-A]uggcs{invAb}	3005	asGfscCa[Ab]UfGuagAfaAfggcaugasusu	3006
D-2711	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgGfGfAUfuguacas{invAb}	3007	asUfsguacAfauccCfaUfgaagcagsusu	3008
D-2712	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfuc[LNA-T]jacas{invAb}	3009	asUfsgu[MeO-I]gAfaaggCfaUfgaagcagsusu	3010
D-2713	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuucaUfGfCfUfUfUf[LNA-mC]uacags{invAb}	3011	asCfsugua[MeO-I]aaagGfcAfugaagcagsusu	3012
D-2714	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuCfaUfGfCfCfu[LNA-T]juacas{invAb}	3013	asUfsgUfaGfa[GNA-A]aggcaUfgAfagcagsusu	3014
D-2715	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuCfaUfGfCfCfu[LNA-T]juacas{invAb}	3015	asUfsgUfaGfa[GNA-A]AfggcaUfgAfagcagsusu	3016
D-2716	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA-T]juacas{invAb}	3017	asUfsguag[MeO-I]aaggCfaUfgaagcagsusu	3018
D-2717	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccfuUfuCfuacaguggcs{invAb}	3019	asGfscCaaguagAfaAfgGfcaugasusu	3020
D-2718	{sGalNAc3K2AhxC6}uauuuCfcUfgCfuucaugccus{invAb}	3021	asAfsggcaugaagCfaGfgAfacaugasusu	3022
D-2719	{sGalNAc3K2AhxC6}ugcuucaFuGfcCfuuuuacags{invAb}	3023	asCfsuguagaagGfcAfuGfaagcagsusu	3024
D-2720	{sGalNAc3K2AhxC6}uguuuccUfgCfUfUfCfaugccuus{invAb}	3025	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacasusu	3026
D-2721	{sGalNAc3K2AhxC6}cugcuuCfaUfgCfcuuuacags{invAb}	3027	asUfsguagaaagCfaUfgAfagcagsusu	3028
D-	{sGalNAc3K2AhxC6}uauuu	3029	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacau	3030

2722	cUfgCfuUfCfaugccus{invAb}		susu	
D- 2723	{sGalNAc3K2AhxC6}uguucc UfgCfuUfCfaugccus{invAb}	3031	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaacasu u	3032
D- 2724	{sGalNAc3K2AhxC6}uauuu CfcUfgCfuucaugccus{invAb}	3033	asAfsaggcaugaagCfaGfgAfacaua susu	3034
D- 2725	{sGalNAc3K2AhxC6}uauuu CfcUfgCfuucaugccus{invAb}	3035	asAfsaggcaugaagCfaGfgAfacaua scsc	3036
D- 2726	{sGalNAc3K2AhxC6}uauuu CfcUfgCfuucaugccus{invAb}	3037	asAfsaggcaugaagCfaGfgAfacaua scsc	3038
D- 2727	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3039	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca susu	3040
D- 2728	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3041	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca usu	3042
D- 2729	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3043	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca usu	3044
D- 2730	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3045	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca susu	3046
D- 2731	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3047	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca susu	3048
D- 2732	uauuuuccUfgCfuUfGfaugccus {invAb}	3049	asAfsaggcaUfcaagCfaGfgaaca usu	3050
D- 2733	uauuuuccUfgCfuUfAfcfaugccus {invAb}	3051	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca susu	3052
D- 2734	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3053	asAfsaggcaUfgaagCfaGfgaaca susu	3054
D- 2735	uauuuuccUfgGfuUfCfaugccus {invAb}	3055	asAfsaggcaUfgaacCfaGfgaaca usu	3056
D- 2736	uauuuuccUfcCfuUfCfaugccus {invAb}	3057	asAfsaggcaUfgaagGfaGfgaaca susu	3058
D- 2737	uauuuuccAfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3059	asAfsaggcaUfgaagCfuGfgaaca susu	3060
D- 2738	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3061	asAfsaggcaUfgaagCfaCfaaca usu	3062
D- 2739	uauuuuccUfgCfuUfCfaugccus {invAb}	3063	asAfsaggcaUfgaagCfaGfaaca usu	3064

2739	{invAb}		usu	
D-2740	uauguaccUfgCfUfUfCfaugccus {invAb}	3065	asAfsggcaUfgaagCfaGfguacaua susu	3066
D-2741	uauguaccUfgCfUfUfCfaugccus {invAb}	3067	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaucaua susu	3068
D-2742	uaucuaccUfgCfUfUfCfaugccus {invAb}	3069	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaagaua susu	3070
D-2743	uaaguaccUfgCfUfUfCfaugccus {invAb}	3071	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacuua susu	3072
D-2744	uuuguaccUfgCfUfUfCfaugccus {invAb}	3073	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacaas usu	3074
D-2745	aauguaccUfgCfUfUfCfaugccus {invAb}	3075	asAfsggcaUfgaagCfaGfgaacauu susu	3076
D-2746	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3077	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3078
D-2747	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3079	asCfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3080
D-2748	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3081	asGfsgcacUfguagAfaAfggcauga susu	3082
D-2749	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3083	asGfsegacUfguagAfaAfggcauga susu	3084
D-2750	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3085	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3086
D-2751	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3087	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3088
D-2752	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3089	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3090
D-2753	ucaugccuUfuCfUfAfGfaguggcs {invAb}	3091	asGfscacUfcuagAfaAfggcauga susu	3092
D-2754	ucaugccuUfuCfUfUfCfaguggcs {invAb}	3093	asGfscacUfgaagAfaAfggcauga susu	3094
D-2755	ucaugccuUfuCfAfAfCfaguggcs {invAb}	3095	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3096
D-	ucaugccuUfuGfUfAfCfaguggcs	3097	asGfscacUfguagAfaAfggcauga	3098

2756	{invAb}		susu	
D-2757	ucaugccuAfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3099	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3100
D-2758	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3101	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3102
D-2759	ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3103	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3104
D-2760	ucaagccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3105	asGfscacUfguagAfaAfggcuuga susu	3106
D-2761	ucuugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3107	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3108
D-2762	ugaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3109	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3110
D-2763	acaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3111	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3112
D-2764	ucaugccuUfaCfUfAfCfaguggcs {invAb}	3113	asGfscacUfguagUfaAfggcauga susu	3114
D-2765	{sGalNAc3K2AhxC6}augccu UfuCfUfAfCfaguggcs{inv Ab}	3115	asGfscacUfguagAfaAfggcauga su	3116
D-2766	{sGalNAc3K2AhxC6}augccu UfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	3117	asGfscacUfguagAfaAfggcauga su	3118
D-2767	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	3119	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3120
D-2768	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb] augccuUfuCfUfacaguggcsu	3121	asGfscacUfguagaaAfgGfcauga su	3122
D-2769	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcC fuUfuCfuacaguggcs{invAb}	3123	asGfscacuguagAfaAfgGfcauga susu	3124
D-2770	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcC fuUfuCfuacaguggcs{invAb}	3125	asGfscacuguagAfaAfgGfcauga sasc	3126
D-2771	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcC fuUfuCfuacaguggcs{invAb}	3127	asGfscacuguagAfaAfgGfcauga sasc	3128
D-2772	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugcc uUfuCfUfAfCfaguggcs{invA	3129	asGfscacUfguagAfaAfggcauga susu	3130

	b}			
D-2773	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	3131	asGfscacUfguagAfaAfggcauga sasc	3132
D-2774	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuCfUfAfCfaguggcs{invAb}	3133	asGfscacUfguagAfaAfggcauga sasc	3134
D-2775	{sGalNAc3K2AhxC6}eugcucaUfgCfCfUfUfu[LNA-mC]uacas{invAb}	3135	asUfsgua[MeO-I]AfaaggCfaUfgaagcagsusu	3136
D-2776	{GalNAc3K2AhxC6}gcggcuUfcGfAfCfGfgcuucasusu	3137	{Фосфат}usAfsGfAfaGfCfcguc GfaAfgccgcsusu	3138
D-2777	{GalNAc3K2AhxC6}gcggcuUfcGfAfCfGfgguucasusu	3139	{Фосфат}usAfsGfAfaCfCfcgucG faAfgccgcsusu	3140
D-2778	{GalNAc3K2AhxC6}gcggcuUfcGfAfCfGfccuucasusu	3141	{Фосфат}usAfsGfAfaGfCfcguc GfaAfgccgcsusu	3142
D-2779	{GalNAc3K2AhxC6}gcggcuUfcGfAfCfGfgcuucasusu	3143	{Фосфат}usAfsGfAfaGfCfcguc GfaAfgccgcsusu	3144
D-2780	{GalNAc3K2AhxC6}gcggcuUfcCfUfGfGfgcuucasusu	3145	[sInvAb]usAfgAfaGfCfcagGfa Afgccgcsusu	3146
D-2781	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgGfGfAfUfuguacausu	3147	{Фосфат}usUfsgUfaCfAfauccC faUfgaagcsusu	3148
D-2782	{sGalNAc3K2AhxC6}ucaugccuUfuGfAfUfCfacuggcs{invAb}	3149	asGfscagUfgaucAfaAfggcauga susu	3150
D-2783	{sGalNAc3K2AhxC6}eugcucaUfgCfCfUfUfucacasc	3151	csUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	3152
D-2784	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucaUgfcGfAfAfUfcaAfcAfgUfsusUf	3153	{Фосфат}asCfsuGfuUfgfauc GfcAfugaagsusu	3154
D-2785	{sGalNAc3K2AhxC6}ggccuuAfuCfCfCfuccuuccususa	3155	usAfsaggAfaGfGfaggAfuAfa gcesasc	3156
D-2786	{sGalNAc3K2AhxC6}gugucuGfaGfUfUfccauccasasa	3157	usUfsuggAfaUfGfgaacUfcAfga cacsca	3158

Пример 2. Эффективность отобранных молекул siRNA PNPLA3 в анализе RNA FISH.

Получали панель полностью химически модифицированной siRNA, включая siRNA, охватывающую rs738409 и/или rs738408 SNP PNPLA3, и тестировали ее на активность и селективность нокдауна мРНК *in vitro*. Каждый дуплекс siRNA состоял из двух нитей: смысловой или 'пассажирской' нити и антисмысловой или 'направляющей' нити. Нити имели длину 21 или 23 нуклеотида с 19 комплементарными парами оснований. В некоторых случаях присутствовали 3'-липкие концы, состоящие из двух пар оснований. Получали siRNA с заменой природной группы 2'-ОН в рибозе каждого нуклеотида на 2'-ОМетило или 2'-F-группу. Сложные фосфодиэфирные межнуклеотидные связи в одной или обеих нитях необязательно были заменены фосфоротиоатами для уменьшения деградации молекулы экзонуклеазами.

Эффективность каждой из молекул siRNA в снижении экспрессии PNPLA3 оценивали с использованием анализа трансфекции siRNA *in vitro* в 384-луночном формате с последующей флуоресцентной гибридизацией *in situ*, нацеленной на молекулы рибонуклеиновой кислоты (RNA FISH), для определения значений IC₅₀ и максимальной активности. Данный анализ выполняли на линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека Hep3B (ATCC HB-8064) и на клетках яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующих PNPLA3 I148I человека. Линию клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека Hep3B поддерживали в среде EMEM (ATCC 30-2003), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 1% антибиотиком/антимикотиком, при 37°C и 5% CO₂. Клетки линии CHO, экспрессирующие PNPLA3 I148I человека, поддерживали в среде, содержащей 50% CD-CHO (Life Technologies), 50% Ex-Cell CHO

5 Medium (Sigma), 8 mM L-глутамин, 1x HT, 1% антибиотик/антимикотик и 10 мкг/мл пуромицина, при 37°C и 5% CO₂.

Для анализов клеток Hep3B трансфекционные комплексы, состоящие из молекул siRNA и реагента для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) в среде EMEM (ATCC 30-2003), вносили в 384-луночные планшеты (PerkinElmer) из расчета 10 мкг на лунку в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализов с клетками CHO человека трансфекционные комплексы, состоящие из молекул siRNA и реагента для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX в среде F12K (Mediatech), вносили в 384-луночные планшеты из расчета 10 мкг/лунка в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки разбавляли до 67000 клеток/мл в среде с антибиотиком/без антибиотика и 30 мкл добавляли в каждую лунку, конечная плотность составляла 2000 клеток/лунка в 40 мкл среды. После 20-минутной инкубации при комнатной температуре планшеты переносили в инкубатор с условиями 37°C и 5% CO₂. Трансфекционные смеси с клетками Hep3B инкубировали в течение 72 ч, а трансфекционные смеси с клетками CHO с PNPLA3 I148I человека инкубировали в течение 48 ч.

При сборе клетки фиксировали в 8% фиксирующем растворе формальдегида (Thermo Scientific) в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем планшеты подвергали дегидратации с последовательной промывкой 50, 70 и 100% этанолом. Затем планшеты запечатывали и хранили при -20°C.

Анализ RNA FISH выполняли с использованием набора для скрининга Affymetrix QuantiGene® View RNA HC Screening Assay (QVP0011), набора для усиления сигнала Affymetrix View HC Signal Amplification Kit 3-plex (QVP0213) от Affymetrix и геноспецифических зондов от Affymetrix: 0,33 мл View RNA тип 6 (метка 650) VA6-20279-01 PNPLA3 человека и 0,44 мл View RNA тип 1 (метка 488) VA1-10148-01 PPIB человека.

Сначала содержимое планшетов регидратировали с последовательными промывками 100, 70 и 50% этанолом. Затем клетки промывали PBS, а затем подвергали пермеабиллизации и расщеплению протеазой в соответствии с инструкциями к набору. Целевые наборы рабочих зондов готовили в соответствии с протоколом производителя, вносили в лунки и инкубировали в течение 3 ч при 40°C. Протокол производителя использовали для последовательных гибридизаций с наборами рабочих зондов, рабочими предварительными усилителями, рабочими усилителями и рабочими LP. В завершении проводили контрокрасивание ядер (Hoechst 33342 и Cell Mask Blue; Molecular Probes). Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали PBS, вносили 80 мкл PBS, а затем планшеты запечатывали для визуализации.

Все планшеты подвергали визуализации с помощью системы скрининга высокого разрешения рега Phenix High Content Screening System (PerkinElmer) с использованием УФ-канала для Hoechst 33342 и Cell Mask Blue, канала с длиной волны 488 нм для зондов типа 1, а также канала с длиной волны 647 нм для зондов типа 6.

Данные RNA FISH анализировали с использованием программного обеспечения Columbus, и изображения были получены с помощью Genedata Screener. Результаты анализа для клеток CHO, трансфицированных PNPLA3 I148I, показаны в табл. 3. Результаты анализа для клеток CHO, трансфицированных PNPLA3 I148M, показаны в табл. 4. Нокдаун PNPLA3 приведен в виде процента нокдауна по сравнению с контролем. Отрицательные значения указывают на снижение уровней PNPLA3.

Таблица 3

Анализ RNA FISH клеток CHO, трансфицированных PNPLA3 I148I

Дуплекс №	IC50 (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2001	.0589	-33,9
D-2002	.0158	-67,2
D-2003	.0427	-43,4
D-2004	.00835	-63,5
D-2006	.0177	-77,8

047656

D-2008	.125	-10,7
D-2009	.00769	-45,5
D-2010	.00558	-80
D-2011	.035	-3
D-2012	> 0,5	-3,7
D-2013	.036	-6,4
D-2014	.0122	-58,2
D-2015	> 0,5	8
D-2016	> 0,5	8
D-2017	.0153	-73,2
D-2018	.00386	-31,5
D-2019	.125	
D-2020	> 0,5	
D-2021	> 0,5	8
D-2022	> 0,167	-6,8
D-2023	.0257	-36,9
D-2024	> 0,5	4
D-2025	> 0,5	-2,5
D-2026	.022	-35,1
D-2027	.00172	-16,5
D-2028	> 0,5	10
D-2029	.0106	-56,2
D-2032	.00205	-52,9
D-2033	.0107	-61,7
D-2034	> 0,5	6
D-2035	> 0,5	-3,8
D-2036	.00665	-55,9
D-2037	> 0,5	4
D-2038	> 0,5	10
D-2039	.0116	-23,9
D-2040	> 0,5	-25,4
D-2041	> 0,5	9
D-2042	.00959	-25,5
D-2043	> 0,5	9

D-2044	.00552	-29
D-2045	> 0,5	9
D-2046	> 0,5	9
D-2047	> 0,5	-5,9
D-2048	.00618	-56,3
D-2049	> 0,5	12
D-2050	> 0,5	10
D-2051	> 0,5	-17,2
D-2052	> 0,5	-8,3
D-2053	> 0,5	11
D-2054	> 0,5	-14,9
D-2055	> 0,5	-10,6
D-2056	> 0,5	10
D-2057	.00485	-59,2
D-2058	.014	-53
D-2059	> 0,5	-4,9
D-2060	> 0,5	18
D-2061	.00795	-44,8
D-2062	.000668	-74,6
D-2063	> 0,5	-21,8
D-2064	> 0,5	9
D-2065	> 0,5	-10,5
D-2066	.0412	-42,2
D-2067	> 0,5	10

Таблица 4

Анализ RNA FISH клеток CHO, трансфицированных PNPLA3 I148M

Дуплекс №	IC50 (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2000	.0316	-29,2
D-2001	.0131	-81,8
D-2002	.00216	-90,5
D-2003	.022	-50,4
D-2004	.00429	-88
D-2005	> 0,5	15
D-2006	.00301	-89,2
D-2007	> 0,5	6

D-2009	.00274	-86,9
D-2010	.00203	-93,3
D-2011	.000694	-11,9
D-2012	> 0,5	-18
D-2013	.011	-66,4
D-2014	.0057	-84,3
D-2015	> 0,5	-13,5
D-2016	> 0,5	-12,4
D-2017	.00448	-89,4
D-2018	.0104	-36,2
D-2019	.0302	-7,7
D-2020	.01	-78,9
D-2021	.00435	-83,5
D-2022	.00628	-88,6
D-2023	.0143	-44,3
D-2024	> 0,5	11
D-2025	.00355	-58,2
D-2026	.000867	-39,4
D-2027	> 0,5	32
D-2028	.00205	-89,9
D-2029	.0019	-94
D-2030	> 0,5	-9,4
D-2031	> 0,5	4

RNA FISH также проводили на линии клеток печени, содержащей двойную мутацию PNPLA3-rs738408-rs738409, а также на контрольной линии клеток Hep3В дикого типа. Клетки Hep3В и HepG2 (приобретенные у ATCC) культивировали в минимальной поддерживающей среде (MEM от Corning для клеток Hep3В и EMEM от ATCC для клеток HepG2), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS, Sigma) и 1% раствором пенициллина-стрептомицина (P-S, Corning). Трансфекцию siRNA проводили следующим образом: 1 мкл тестируемых siRNA и 4 мкл простой MEM или EMEM, в зависимости от клеточной линии, добавляли в планшеты для анализа CellCarrier-384 Ultra, покрытые PDL (PerkinElmer), от BioMek FX (Beckman Coulter). 5 мкл Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), предварительно разбавленного в простой MEM или EMEM (а именно, 0,035 мкл RNAiMAX в 5 мкл MEM для клеток Hep3В и 0,06 мкл RNAiMAX в 5 мкл EMEM для клеток HepG2), затем дозировали в планшеты для анализа с помощью дозатора для реагентов Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific). После 20 мин инкубации смеси siRNA/RNAiMAX при комнатной температуре (RT) в трансфекционный комплекс с помощью дозатора для реагентов Multidrop Combi добавляли 30 мкл клеток Hep3В либо клеток HepG2 (2000 клеток на лунку) в MEM или EMEM, дополненной 10% FBS и 1% P-S. Планшеты для анализа инкубировали в течение 20 мин при RT до помещения в инкубатор. Затем клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂. Анализ клеток ViewRNA ISH проводили в соответствии с протоколом производителя (Thermo Fisher Scientific) с использованием самостоятельно собранной автоматизированной платформы для анализа FISH, предназначенной для работы с жидкостями. Вкратце клетки фиксировали в 4% формальдегиде (Thermo Fisher Scientific) в течение 15 мин при RT, пермеабелизировали при помощи детергента в течение 3 мин при RT, а затем обрабатывали раствором протеазы в течение 10 мин при RT. Инкубацию мишень-специфических пар зондов (Thermo Fisher Scientific) проводили в течение 3 ч, в то время как для предусилителей, усилителей и зондов с метками (Thermo Fisher Scientific) ее проводили по 1 ч. Все стадии гибридизации выполняли при 40°C в автоматизированном инкубаторе Cytomat 2 C-LIN (Thermo Fisher Scientific). После реакций гибридизации проводили окрашивание клеток Hoechst и CellMask Blue (Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин, а затем проводили визуализацию с помощью Opera Phenix (PerkinElmer). Изображения анализировали с использованием системы для хранения и анализа данных Columbus Image (PerkinElmer) с получением среднего значения числа пятен на клетку. Подсчет пятен нормализовали с использованием контрольных лунок с высоким значением (содержащих фосфатно-буферный солевой раствор от Corning) и с низким значением (без пар целевых зондов). Нормализованные значения по отношению к концентрациям общей siRNA наносили на график, и данные сопоставляли с четырехпараметрической сигмоидальной моделью в Genedata Screener (Genedata) для получения значений IC₅₀ и максимальной активности. Результаты анализов для клеток HepG2 показаны в табл. 5, а результаты анализов для клеток Hep3В показаны в табл. 6.

Нокдаун PNPLA3 приведен в виде процента нокдауна по сравнению с контролем. Отрицательные значения указывают на снижение уровней PNPLA3. В тех случаях, когда дуплекс проходил анализ более одного раза, со стандартным отклонением показано среднее значение IC₅₀.

Таблица 5

Анализ RNA FISH гепатоцитов HepG2

Дуплекс №	IC ₅₀ (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2001	.0132	-70,5
D-2003	.0458	-46,9
D-2004	.0049	-74,2
D-2006	.00283	-69,6
D-2009	.00448	-62,2
D-2010	.00206	-52
D-2013	.00319	-71,7
D-2014	.00164	-67,4
D-2017	.00222	-60,9
D-2018	.00717	-52,7
D-2020	.00664	-68,3
D-2021	.00559	-61,5
D-2022	.004	-30,5
D-2023	> 0,5	-18
D-2025	.0041	-61,9
D-2026	.00937	-34,6
D-2043	> 0,1	-5,394
D-2045	> 0,1	-37,195
D-2046	> 0,1	0,94
D-2047	> 0,1	-11,446
D-2048	0,000355	-56,824
D-2049	Не определено	-30,881
D-2050	> 0,1	-11,814
D-2051	0,000903	-73,749
D-2052	0,000235	-38,467
D-2053	0,000142	-19,405
D-2054	> 0,1	-29,069
D-2055	> 0,1	-31,986
D-2056	Не определено	-38,596
D-2057	0,000197	-87,199
D-2058	0,00126	-40,177
D-2059	> 0,1	-11,162
D-2060	> 0,1	-8,147
D-2069	0,0329	-62,804
D-2072	0,00377	-47,552
D-2078	> 0,1	-25,077
D-2073	0,00602	-54,092
D-2084	0,000549	-45,854
D-2084	0,0018	-60,106
D-2085	0,000122	-38,539

047656

D-2085	0,0076	-68,83
D-2086	0,00182	-25,524
D-2087	0,00103	-53,242
D-2088	0,00111	-26,614
D-2089	0,000776	-55,436
D-2089	0,000457 +/- 0,000174	-62,57 +/- 1,46
D-2090	Не определено	-56,094
D-2092	0,000979	-52,168
D-2099	0,000727	-43,233
D-2100	0,000152	-40,651
D-2104	0,000712	-72,734
D-2105	0,000129	-75,994
D-2128	0,00154	-60,927
D-2138	0,0142	-63,864
D-2149	0,000518	-74,288
D-2152	0,00524	-64,758
D-2153	0,00149	-72,861
D-2155	> 0,1	-32,937
D-2156	0,0183	-75,145
D-2157	> 0,0333	-37,881
D-2158	0,00368	-79,231
D-2159	0,00167	-85,848
D-2160	0,00442	-37,827
D-2172	0,0000615	-74,462
D-2182	0,000211	-79,605
D-2183	0,000159	-80,865
D-2187	0,00109	-67,777
D-2188	0,000728	-71,503
D-2189	0,000224	-58,772
D-2190	0,000803	-72,508
D-2192	0,00125	-33,021
D-2193	0,000152	-74,239
D-2194	0,00385	-50,848
D-2196	0,000362	-70,158

047656

D-2197	0,000180	-54,44
D-2198	0,000269	-45,556
D-2199	0,000198	-81,082
D-2201	0,000356	-82,2
D-2202	0,000123	-62,466
D-2203	0,00476	-68,112
D-2204	0,000300	-63,383
D-2205	0,000442	-70,712
D-2206	0,000969	-74,194
D-2208	0,000202	-64,046
D-2209	0,000752	-63,083
D-2210	0,0000991	-60,426
D-2211	0,0000948	-71,098
D-2213	0,00119	-65,57
D-2214	0,000293	-72,959
D-2215	0,000307	-64,561
D-2217	0,00198	-87,273
D-2218	0,000186	-64,522
D-2219	0,000577	-74,879
D-2220	0,000189	-74,278
D-2221	0,000173	-54,639
D-2223	0,00131	-69,834
D-2224	0,000527	-84,911
D-2225	0,000561	-68,969
D-2226	0,00109	-75,536
D-2227	0,000227	-85,915
D-2228	0,00202	-50,227
D-2229	Не определено	-59,847
D-2230	0,000156	-53,194
D-2231	0,000351	-65,054
D-2232	0,0000619	-63,991
D-2233	0,0000982	-74,304
D-2234	0,000290	-81,992
D-2235	0,000127	-83,593

047656

D-2236	0,000243	-80,826
D-2237	0,0000711	-62,814
D-2238	0,0000690	-76,476
D-2239	0,000123	-74,747
D-2240	0,000120	-79,301
D-2241	0,000201	-88,769
D-2242	0,000179	-84,503
D-2243	0,000264	-88,712
D-2244	0,0000605	-82,556
D-2245	0,000125	-83,93
D-2246	0,000122	-84,41
D-2247	0,000100	-81,777
D-2248	0,000141	-79,18
D-2249	0,0000710	-85,093
D-2250	0,000494	-81,724
D-2251	0,000196	-87,601
D-2252	0,0000796	-62,87
D-2253	0,000501	-78,699
D-2254	0,0000979	-67,617
D-2255	0,000359	-81,18
D-2256	0,000610	-98,206
D-2257	0,000151	-76,718
D-2258	0,000325	-87,548
D-2259	0,000124	-82,545
D-2260	0,000109	-85,47
D-2261	0,000231	-75,386
D-2262	0,000162	-72,407
D-2263	0,000271	-74,968
D-2264	0,000132	-76,418
D-2265	> 0,1	-17,144
D-2266	Не определено	-58,475
D-2267	> 0,1	-3,991
D-2280	0,0000390	-85,368
D-2286	0,00304	-89,536

047656

D-2287	0,00142	-85,435
D-2287	0,000261	-66,501
D-2288	0,000839	-81,988
D-2289	0,0012	-83,437
D-2289	0,00168	-69,471
D-2290	0,00157	-73,089
D-2291	0,0112	-64,108
D-2292	0,00411	-66,681
D-2292	0,00138	-56,253
D-2293	0,00112	-61,118
D-2294	0,000408	-70,684
D-2295	0,000195	-65,493
D-2297	0,00165	-61,821
D-2297	0,000684	-69,444
D-2318	0,000986	-69,28
D-2319	0,00136	-67,654
D-2320	0,00129	-83,723
D-2323	0,00194	-74,525
D-2324	0,00209	-63,745
D-2325	0,000301	-81,302
D-2327	0,000306	-77,959
D-2327	0,000610	-56,293
D-2328	0,000131	-72,631
D-2345	0,000131	-72,677
D-2346	0,0000274	-71,459
D-2347	0,000640	-78,414
D-2348	0,000101	-64,627
D-2349	0,000487	-52,131
D-2350	0,000102	-68,668
D-2351	Не определено	-70,229
D-2352	0,000332	-81,083
D-2352	0,0027713 +/- 0,00426	-68,138 +/- 9,28
D-2353	0,000410	-83,001
D-2353	0,00215	-64,343

047656

D-2354	0,003405 +/- 0,00185	-72,56 +/- 7,42
D-2354	0,000362	-72,776
D-2355	0,00215	-69,321
D-2358	0,0011	-61,081
D-2359	0,000654	-76,258
D-2360	Не определено	-59,027
D-2361	0,00414	-57,88
D-2362	0,000772	-87,512
D-2364	0,00104	-53,895
D-2370	0,0024	-83,423
D-2371	0,00418	-72,262
D-2372	0,00492	-67,648
D-2373	0,000906	-64,099
D-2374	0,00282	-64,049
D-2375	0,00125	-59,813
D-2376	0,00171	-63,025
D-2377	0,00168	-61,597
D-2378	0,00505	-72,446
D-2379	0,00511	-80,576
D-2380	0,0497	-82,835
D-2381	0,000944	-71,788
D-2382	0,000830	-65,087
D-2383	0,00118	-71,393
D-2386	0,0000367	-44,073
D-2387	0,00224	-74,24
D-2390	0,00188	-69,313
D-2391	0,000493	-72,314
D-2393	0,008875 +/- 0,0112	-48,855 +/- 15,6
D-2401	0,000125	-69,217
D-2409	0,00479	-68,703
D-2402	> 0,5	21,01 +/- 6,08
D-2410	0,00533	-64,812
D-2411	0,00283	-64,889
D-2412	0,00211	-67,781

047656

D-2413	0,006575 +/- 0,0000212	-64,021 +/- 15,8
D-2417	0,00558	-50,293
D-2418	0,00566	-59,533
D-2419	> 0,5	-15,364 +/- 7,56
D-2423	0,000498 +/- 0,000414	-65,15 +/- 17,5
D-2426	> 0,1	-15,207
D-2430	0,0000511	-63,602
D-2444	0,000262 +/- 0,000192	-67,206 +/- 9,13
D-2454	0,001795 +/- 0,000106	-51,619 +/- 0,163
D-2456	0,000274	-61,291
D-2472	0,000314	-70,624
D-2473	> 0,1	-19,624 +/- 7,27
D-2474	0,000339	-37,846
D-2475	0,002249 +/- 0,00231	-41,661 +/- 8,64
D-2476	0,000594	-26,48
D-2477	0,000547	-61,592
D-2478	0,000168	-65,904
D-2479	0,0005565	-65,14
D-2480	0,000907	-53,271
D-2481	0,0004005	-59,5
D-2482	0,000493	-61,712
D-2483	0,0004015 +/- 0,000218	-66,803 +/- .197
D-2484	0,0003375	-67,4
D-2485	0,0002865	-44,529
D-2486	0,0012575	-62,847
D-2487	0,000454	-54,396
D-2488	0,0002415	-66,315
D-2489	> 0,5	-2,973 +/- 1,98
D-2490	0,0011555	-62,566
D-2491	0,0006005	-60,304
D-2492	0,0007775	-47,748
D-2493	0,001465	-48,8
D-2494	0,0008985	-50,707

047656

D-2495	0,001317	-55,5
D-2496	0,0001374	-68,949
D-2497	0,00013615 +/- 0,0000691	-72,763 +/- 4,02
D-2498	0,000332 +/- 0,000259	-82,507 +/- 6,15
D-2499	0,0004155	-75,4
D-2500	0,0000742 +/- 0,0000407	-74,968 +/- 5,41
D-2501	> 0,5	-1,648 +/- 2,2
D-2502	0,0002705 +/- 0,000252	-68,406 +/- 5,36
D-2503	0,000313 +/- 0,000198	-67,858 +/- 8,2
D-2504	0,0006445 +/- 0,000385	-59,733 +/- 7,96
D-2505	0,0004985	-53,3
D-2506	> 0,1	-16,588 +/- 14,9
D-2507	0,002136	-64,978
D-2508	> 0,1	-20,61 +/- 11,1
D-2509	0,001242	-65,112
D-2510	0,0015895	-56,416
D-2511	0,00166	-19,901
D-2512	0,000593	-0,374
D-2513	0,0001497 +/- 0,000123	-69,663 +/- 11,6
D-2514	0,000204 +/- 0,0000594	-69,924 +/- 13,7
D-2515	0,000331 +/- 0,000129	-71,29 +/- 8,74
D-2516	0,000348 +/- 0,000249	-65,905 +/- 14,8
D-2517	0,000452 +/- 0,000322	-68,212 +/- 11,2
D-2518	0,0006965	-73,226
D-2519	> 0,5	-1,486 +/- 4,67
D-2520	0,000098	-75,127
D-2521	0,000717 +/- 0,000378	-61,216 +/- 12,8
D-2522	0,000661 +/- 0,000748	-56,771 +/- 16,9
D-2523	0,0003685	-73,312
D-2524	0,0002745 +/- 0,0000686	-65,341 +/- 12,7
D-2525	0,003855 +/- 0,0033	-44,288 +/- 19,0
D-2526	0,0006115 +/- 0,000204	-57,77 +/- 13,2
D-2527	0,000333	-77,405
D-2528	0,0002665 +/- 0,000105	-62,407 +/- 8,65

047656

D-2529	0,0076967 +/- 0,00555	-44,194 +/- 6,73
D-2530	0,0132	-42,657 +/- 0,222
D-2531	0,00312	-32,789 +/- 12,0
D-2532	0,005795 +/- 0,00268	-44,051 +/- 2,82
D-2533	0,005515 +/- 0,00356	-43,145
D-2534	0,0129	-28,734 +/- 16,4
D-2535	0,003195 +/- 0,000233	-29,79
D-2536	0,005865 +/- 0,00456	-25,918
D-2537	0,0133	-25,755 +/- 3,32
D-2538	> 0,1	-40,955 +/- 5,3
D-2539	0,004785 +/- 0,00183	-34,334 +/- 11,0
D-2540	0,0044 +/- 0,00075	-39,221
D-2541	0,002735 +/- 0,00141	-62,39 +/- 3,03
D-2542	0,01323 +/- 0,0108	-30,917 +/- 1,57
D-2543	> 0,1	-8,54 +/- 8,37
D-2544	0,017	-23,757 +/- 2,2
D-2545	0,01642 +/- 0,0164	-52,394 +/- 7,21
D-2546	> 0,1	-25,351 +/- 7,84
D-2547	0,00412	-25,042 +/- 5,28
D-2548	0,00411 +/- 0,00184	-40,406 +/- 1,26
D-2549	0,02285 +/- 0,00318	-53,713 +/- 14,1
D-2550	0,015935 +/- 0,0115	-41,907
D-2551	0,00795	-26,39
D-2552	0,01165 +/- 0,00841	-41,306
D-2553	0,00361	-70,457
D-2554	0,00656	-42,866
D-2555	> 0,1	-11,425
D-2556	0,00336	-63,996
D-2557	> 0,1	-2,734
D-2558	0,00251	-66,775
D-2559	> 0,1	-7,034
D-2560	0,0234	-44,657
D-2561	0,00154	-74,225
D-2562	0,00454	-66,578

047656

D-2563	0,00182	-77,025
D-2564	0,009	-64,021
D-2565	0,00609	-70,965
D-2566	0,00255	-52,65
D-2567	0,00584	-56,603
D-2568	0,0157	-63,002
D-2569	0,00327	-64,898
D-2570	0,00144	-55,424
D-2571	> 0,1	-18,661
D-2572	0,00557	-25,668
D-2573	0,0115	-55,329
D-2574	0,00289	-69,84
D-2575	0,00378	-69,491
D-2576	0,00527	-64,841
D-2577	0,00511	-46,449
D-2578	0,0026	-67,821
D-2579	0,00402	-67,057
D-2580	0,00119	-64,422
D-2581	0,00915	-73,008
D-2582	0,000823	-77,053
D-2583	0,00851	-66,555
D-2584	0,00513	-54,442
D-2585	0,0154	-67,707
D-2586	0,00701	-69,624
D-2587	0,00732	-66,627
D-2588	0,00226	-70,854

047656

D-2589	0,00837	-31,221
D-2590	0,0249	-41,857
D-2591	0,009	-64,021
D-2592	0,00609	-70,965
D-2593	0,00255	-52,65
D-2594	0,00584	-56,603
D-2595	0,0157	-63,002
D-2596	0,00327	-64,898
D-2597	0,00144	-55,424
D-2598	> 0,1	-18,661
D-2599	0,00557	-25,668
D-2600	0,0115	-55,329
D-2601	0,00289	-69,84
D-2602	0,00378	-69,491
D-2603	0,00527	-64,841
D-2604	0,00511	-46,449
D-2605	0,0026	-67,821
D-2606	0,00402	-67,057
D-2607	0,00119	-64,422
D-2608	0,00915	-73,008
D-2609	0,000823	-77,053
D-2610	0,00141	-37,663 +/- 39,4
D 2611	> 0,1	2,829 +/- 0,006
D-2612	> 0,1	-15,894
D-2613	0,00809	-58,833
D-2614	0,00204	-73,042
D-2615	0,00306	-70,087
D-2616	7,95E-04	-71,014

047656

D-2617	0,00218	-75,769
D-2618	0,0429	-31,19 +/- 2,61
D-2619	0,02495 +/- 0,0192	-59,645 +/- 13,4
D-2620	0,0055 +/- 0,00329	-73,308 +/- 5,33
D-2621	0,004705 +/- 0,00176	-63,053 +/- 7,66
D-2622	0,004525 +/- 0,00231	-66,895 +/- 7,78
D-2623	0,00435	-31,366 +/- 14,5
D-2624	0,0056 +/- 0,0016	-65,16 +/- 10,9
D-2625	0,00764 +/- 0,00115	-73,065 +/- 9,97
D-2626	0,021645 +/- 0,0267	-71,117 +/- 3,63
D-2627	0,00651 +/- 0,00489	-63,009 +/- 8,83
D-2628	0,01334 +/- 0,00588	-48,771 +/- 2,35
D-2629	0,005504 +/- 0,00434	-74,111 +/- 4,61
D-2630	0,007965 +/- 0,00684	-70,17 +/- 5,32
D-2631	> 0,1	-8,645
D-2632	> 0,1	-37,841
D-2633	0,0111	-53,354
D-2634	0,0187	-63,686
D-2635	0,00797	-58,605
D-2636	> 0,1	-34,727
D-2637	0,00541	-61,225
D-2638	0,00397	-62,221
D-2639	0,0295 +/- 0,0187	-51,328 +/- 12,8
D-2640	0,0212	-37,799 +/- 16,1
D-2641	0,00164	-21,913 +/- 14,1
D-2642	> 0,1	-11,733 +/- 23,5
D-2643	> 0,1	-23,009
D-2644	0,00165	-46,514
D-2645	0,00242	-75,956
D-2646	> 0,1	-15,539 +/- 1,03
D-2647	0,00243	-73,363
D-2648	0,00117 +/- 0,0000849	-74,63 +/- 1,55
D-2649	0,007455 +/- 0,00756	-46,662 +/- 2,86
D-2650	0,003845 +/- 0,00122	-67,914 +/- 1,87

047656

D-2651	0,000449	-70,274
D-2652	0,0014	-66,6
D-2653	0,00299	-59,695
D-2654	0,00431	-26,338 +/- 4,54
D-2655	0,00254 +/- 0,0012	-52,632 +/- 0,938
D-2656	0,003275 +/- 0,00112	-37,351 +/- 0,79
D-2657	0,007435 +/- 0,00357	-37,313 +/- 3,03
D-2658	> 0,1	-22,486 +/- 10,6
D-2659	> 0,1	-10,905 +/- 3,7
D-2660	> 0,1	-4,489 +/- 8,45
D-2661	0,00875 +/- 0,00728	-56,877 +/- 9,41
D-2662	> 0,1	-8,133
D-2663	0,00268 +/- 0,000778	-73,024 +/- 1,16
D-2664	0,008	-30,908 +/- 1,19
D-2665	0,004675 +/- 0,000516	-39,914 +/- 3,72
D-2666	0,004085 +/- 0,000106	-46,423 +/- 3,66
D-2667	0,017107 +/- 0,0145	-72,967 +/- 2,96
D-2668	0,00589 +/- 0,000919	-73,779 +/- 2,9
D-2669	0,0035033 +/- 0,00167	-67,153 +/- 0,761
D-2670	0,0129	-59,149 +/- 0,371
D-2671	0,0157 +/- 0,00156	-57,5 +/- 3,88
D-2672	> 0,1	-3,262 +/- 6,36
D-2673	0,00461 +/- 0,00173	-50,295 +/- 14,1
D-2674	0,00279	-54,886 +/- 32,2
D-2675	> 0,1	-13,5 +/- 21,4
D-2676	0,015075 +/- 0,0156	-50,255 +/- 8,86
D-2677	> 0,1	-22,123
D-2678	> 0,1	-43,995
D-2679	0,00268	-83,804
D-2680	> 0,1	-47,702
D-2681	> 0,1	-38,246
D-2682	0,00305 +/- 0,000255	-70,849 +/- 11,3
D-2683	0,00363	-59,037 +/- 15,6
D-2684	0,00763	-74,35

047656

D-2685	0,00585 +/- 0,00379	-72,725 +/- 18,8
D-2686	> 0,1	-6,429
D-2687	0,0031933 +/- 0,000225	-70,122 +/- 5,47
D-2688	0,0023063 +/- 0,00152	-65,267 +/- 8,73
D-2689	0,0025767 +/- 0,000721	-66,016 +/- 11,4
D-2690	0,0032367 +/- 0,00272	-63,04 +/- 13,4
D-2691	> 0,1	-63,208
D-2692	0,00376	-62,833
D-2693	0,002915 +/- 0,00131	-71,229 +/- 10,9
D-2694	0,003245 +/- 0,000573	-69,264
D-2695	0,01652 +/- 0,0179	-51,139 +/- 17,8
D-2696	0,0024	12,88
D-2697	0,013	-63,845
D-2698	0,003285 +/- 0,000304	-79,24
D-2699	0,002205 +/- 0,00117	-67,306 +/- 0,216
D-2700	0,0022297 +/- 0,00129	-67,949 +/- 7,66
D-2701	0,0026037 +/- 0,00196	-54,669 +/- 7,49
D-2702	0,00448	-64,496
D-2703	0,00254	-65,869
D-2704	0,00257	-71,285
D-2705	0,002505 +/- 0,000346	-64,722 +/- 4,62
D-2706	0,003865 +/- 0,00264	-63,247 +/- 10,0
D-2707	0,003425 +/- 0,000318	-65,82 +/- 2,07
D-2708	0,0055112 +/- 0,00582	-66,395 +/- 10,4
D-2709	0,00243	-76,778
D-2710	0,000912	-78,289
D-2711	> 0,1	4,37 +/- 9,89
D-2712	0,0046104 +/- 0,00608	-65,876 +/- 9,59
D-2713	0,0010115 +/- 0,00102	-67,741 +/- 2,46
D-2714	0,0063585 +/- 0,00869	-66,904 +/- 0,044
D-2715	0,0061022 +/- 0,00862	-74,054
D-2716	0,00338 +/- 0,00308	-70,054 +/- 9,47
D-2717	0,0033 +/- 0,00155	-72,932 +/- 7,6
D-2718	0,0155	-58,784

047656

D-2719	0,00527	-57,281
D-2720	0,0215	-41,76
D-2721	0,01829 +/- 0,0132	-64,649 +/- 3,84
D-2722	0,0164	-53,261
D-2723	0,00733	-47,56
D-2724	0,00564	-37,19
D-2725	0,00776	-42,77
D-2726	0,00675	-42,811
D-2727	0,00667	-57,414
D-2728	0,0438	-37,169
D-2729	0,00454	-25,538
D-2730	0,0241	-47,501
D-2731	0,0088	-44,866
D-2732	0,0326	-44,68
D-2733	0,0217	-25,146
D-2734	> 0,1	-14,582
D-2735	0,0202	-28,294
D-2736	0,014	-38,251
D-2737	> 0,1	-17,833
D-2738	0,00514	-62,424
D-2739	0,0317	-41,409
D-2740	0,0111	-59,253
D-2741	0,0111	-59,687
D-2742	0,0229	-82,351
D-2743	0,00933	-59,271
D-2744	0,0215	-54,24
D-2745	0,00619	-57,406
D-2746	0,00654	-69,738
D-2747	0,0307	-63,431
D-2748	0,0152	-59,477
D-2749	0,0329	-45,543
D-2750	0,0149	-47,589
D-2751	0,0261	-54,747
D-2752	0,0106	-65,912

D-2753	0,0113	-66,051
D-2754	0,0201	-65,582
D-2755	> 0,1	-25,144
D-2756	0,0179	-65,965
D-2757	0,0251	-40,795
D-2758	0,0312	-40,55
D-2759	0,00936	-63,545
D-2760	0,00859	-74,99
D-2761	0,0115	-71,716
D-2762	0,00777	-68,169
D-2763	0,0106	-72,426
D-2764	0,0327	-58,009
D-2766	0,003215 +/- 0,000516	-77,976
D-2767	0,00376 +/- 0,000552	-74,346
D-2768	0,00396 +/- 0,0000566	-76,319
D-2769	0,005655 +/- 0,00165	-72,844 +/- 3,26
D-2770	0,0041 +/- 0,000778	-79,301 +/- 1,36
D-2771	0,00891 +/- 0,00137	-70,223
D-2772	0,004855 +/- 0,00000707	-72,651
D-2773	0,004115 +/- 0,000544	-77,716 +/- 5,2
D-2774	0,00467 +/- 0,000354	-76,397 +/- 3,67

Таблица 6

Анализ RNA FISH гепатоцитов Hep3B

Дуплекс №	IC50 (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2001	.00842	-37
D-2003	.0158	-32,1
D-2004	.00266	-32,4
D-2006	.00948	-54,1
D-2009	.00228	-29,5
D-2010	.00219	-37,2
D-2013	.00524	-31,5
D-2014	.00148	-37,6
D-2017	.00333	-37,6
D-2018	.00315	-21,3

047656

D-2020	> 0,5	6
D-2021	> 0,5	-1,6
D-2022	.00272	-30,9
D-2023	> 0,5	24
D-2025	.0101	-30,3
D-2026	.00551	-23
D-2413		-45,832
D-2419	> 0,5	-4,545
D-2426	> 0,1	-15,207
D-2454	0,00187	-51,735
D-2473	> 0,1	-21,333
D-2522	0,00504	-43,036
D-2523	0,0122	-52,084
D-2564	0,01	-63,199
D-2565	0,00938	-58,392
D-2566	0,00343	-61,484
D-2567	0,0175	-53,489
D-2568	> 0,1	-18,367
D-2569	0,0195	-62,568
D-2570	0,0127	-77,141
D-2571	> 0,1	-15,922
D-2572	> 0,1	-12,434
D-2573	> 0,1	-14,649
D-2574	0,0215	-52,515
D-2575	0,0203	-53,175
D-2576	0,018	-48,137
D-2577	> 0,1	-16,105
D-2578	> 0,1	-21,309
D-2579	> 0,1	-17,510
D-2580	> 0,1	-24,616
D-2581	> 0,1	-13,987
D-2582	0,0574	-30,543
D-2583	> 0,1	-23,990
D-2584	> 0,1	-6,715

047656

D-2585	> 0,1	-17,518
D-2586	> 0,1	-24,518
D-2587	0,0391	-58,478
D-2588	0,0218	-56,609
D-2589	> 0,1	-17,418
D-2590	> 0,1	-21,161
D-2591	0,0167	-59,366
D-2592	0,0104	-61,548
D-2593	Не определено	-61,879
D-2594	0,0211	-43,856
D-2595	0,0272	-63,020
D-2596	> 0,1	-10,278
D-2597	0,0546	-31,743
D-2598	Не определено	-47,517
D-2599	0,00489	-70,825
D-2600	> 0,1	-8,522
D-2601	0,0364	-31,836
D-2602	0,00577	-65,062
D-2603	0,01	-58,287
D-2604	0,00353	-40,649
D-2605	0,0113	-50,691
D-2606	> 0,1	-5,097
D-2607	0,0261	-49,898
D-2608	> 0,1	-23,747
D-2609	> 0,1	-23,804
D-2620	> 0,5	-21,969
D-2637	>0,1	-12,63
D-2638	>0,1	-16,25
D-2639	>0,1	-22,905
D-2640	>0,1	-14,572
D-2666	> 0,5	-14,898
D-2667	> 0,5	-14,537
D-2668	> 0,5	-18,779
D-2669	> 0,5	-8,624

047656

D-2670	> 0,5	-16,641
D-2671	> 0,5	-8,665
D-2672	> 0,5	4,92
D-2673	> 0,5	-8,024
D-2675	> 0,5	-17,999
D-2676	> 0,5	-22,989
D-2677	> 0,5	-11,245
D-2678	> 0,5	-10,209
D-2679		-46,578
D-2680	> 0,5	-12,289
D-2681	> 0,5	-9,564
D-2682	0,184	-57,848
D-2683	> 0,5	-19,024
D-2684	> 0,5	-5,026
D-2685	0,0395	-34,673
D-2686	> 0,5	-12,298
D-2687	> 0,5	-7,153
D-2688	> 0,5	-12,895
D-2689	> 0,5	-20,429
D-2690	> 0,5	-8,608
D-2691	> 0,5	-7,608
D-2692	> 0,5	-7,763
D-2693	> 0,5	-12,294
D-2694	> 0,5	-10,718
D-2695		-25,618
D-2696	> 0,5	-7,666
D-2697	> 0,5	-11,529
D-2698	> 0,5	-11,875
D-2699	> 0,5	-4,132
D-2700		-34,399
D-2701	> 0,5	-4,434
D-2702	> 0,5	-9,919
D-2703	> 0,5	-9,667
D-2704	> 0,5	-1,989

047656

D-2705	> 0,5	-8,5
D-2706	>0,167	
D-2707	>0,167	
D-2708	0,103	-32,624
D-2709	> 0,5	-2,042
D-2710	> 0,5	-5,079
D-2712	> 0,5	-1,399
D-2717	> 0,5	-1,399
D-2718	0,00521	-38,552
D-2719	0,013	
D-2720	> 0,5	-2,52
D-2721	> 0,5	-3,882
D-2722	> 0,5	-6,527
D-2723	> 0,5	-16,917
D-2724	0,0227	-46,386
D-2725	0,0187	
D-2726	0,0105	
D-2727	0,0124	-38,592
D-2728	0,00741	-30,796
D-2729	0,0152	-36,3
D-2730	> 0,5	-17,996
D-2731	0,00433	-45,007
D-2732	> 0,5	-4,662
D-2733	> 0,5	-8,838
D-2734	> 0,5	-11,614
D-2735	> 0,5	-15,778
D-2736	> 0,5	-17,337
D-2737	> 0,5	-11,139
D-2717	> 0,5	-6,604
D-2738	0,00878	-30,636
D-2739	> 0,5	-12,614
D-2740	0,013	-57,307
D-2741	0,00938	-48,272
D-2742	0,0271	

D-2743	0,00623	-41,449
D-2744	0,015	-37,951
D-2745	0,00611	-53,267
D-2746	0,0108	-63,434
D-2747	> 0,5	-13,578
D-2748	0,0382	-38,04
D-2749	> 0,5	-8,412
D-2750	> 0,5	-2,25
D-2751	> 0,5	-12,014
D-2752	> 0,5	10,68
D-2753	> 0,5	-3,443
D-2754	0,0704	-40,897
D-2755	> 0,5	-9,405
D-2756	> 0,5	-18,327
D-2757	> 0,5	-10,531
D-2758	> 0,5	-13,929
D-2759	0,0174	-39,948
D-2760	0,048	-66,415
D-2761	> 0,5	-14,128
D-2762	0,0132	-61,074
D-2763	0,0333	-67,071
D-2764	> 0,5	-10,771
D-2413		-45,832
D-2419	> 0,5	-4,545

Пример 3. Анализ с помощью капельной цифровой ПЦР siRNA для PNPLA3-rs738409 и PNPLA3-rs738409-rs738408.

Следуя протоколу производителя, размороженные первичные гепатоциты человека (Xenotech/донорская партия Sekisui HC3-38) в среде OptiThaw (№ по кат. K8000 Xenotech) центрифугировали и после аспирации среды ресуспендировали в среде для гепатоцитов OptiPlate (№ по кат. K8200 Xenotech), после чего вносили в 96-луночные планшеты с коллагеновым покрытием (№ по кат. Greiner 655950). После 2-4-часового периода инкубации среду удаляли и заменяли средой для гепатоцитов OptiCulture (№ по кат. K8300 Xenotech). Через 2-4 ч после добавления среды OptiCulture в клетки поступали siRNA, конъюгированные с GalNAc, путем свободного захвата клетками (без реагента для трансфекции). Клетки инкубировали в течение 24-72 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки лизировали буфером Qiagen RLT (79216) + 1% 2-меркаптоэтанол (Sigma, M-3148), и лизаты хранили при -20°C. Очистку РНК проводили с использованием прибора Qiagen QIAcube HT (9001793) и набора Qiagen RNeasy 96 QIAcube HT Kit (74171) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали с использованием системы QIAxpert (9002340). кДНК синтезировали из образцов РНК с использованием набора для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК Applied Biosystems (4368813), при этом реакции проводили в соответствии с инструкциями производителя, а концентрация вносимой РНК зависела от образца. Обратную транскрипцию проводили на термоциклере BioRad tetrad (модель № PTC-0240G) в следующих условиях: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 мин с последующим (необязательно) неограниченным по времени выдерживанием при 4°C.

Капельную цифровую ПЦР (ddPCR) проводили с использованием системы для капельной цифровой ПЦР AutoDG QX200 от BioRad в соответствии с инструкциями производителя. Реакционные смеси составляли в прозрачном 96-луночном планшете для ПЦР от Eppendorf (951020303) с использованием BioRad ddPCR Supermix для зондов (1863010) и флуоресцентно меченых смесей для анализов qPCR для PNPLA3 (IDT Hs.PT.58.21464637, соотношение праймера и зонда 3.6:1 и TBP (IDT Hs.PT.53a.20105486, соотношение праймера и зонда 3.6:1) и воды, не содержащей РНКаз (Ambion, AM9937). Конечная концентрация праймера/зонда составляла 900 нМ/250 нМ соответственно, начальная концентрация кДНК отличалась для разных лунок. Капли формировали с использованием генератора капель BioRad Auto DG (1864101), настроенного с учетом рекомендуемых производителем расходных материалов (картриджи BioRad DG32 1864108, наконечники BioRad 1864121, 96-луночный планшет для ПЦР Eppendorf blue 951020362, масло для генерации капель для зондов BioRad 1864110 и собранная панель для капель

BioRad). Капли подвергали амплификации на термоциклере BioRad C1000 touch (1851197), используя следующие условия: активация фермента при 95°C в течение 10 мин, денатурация при 94°C в течение 30 с с последующим отжигом/элонгацией при 60°C в течение 1 мин, 40 циклов со скоростью нагрева/охлаждения 2°C/с, инактивация фермента при 98°C в течение 10 мин с последующим (необязательно) неограниченным по времени выдерживанием при 4°C. Затем образцы считывали на устройстве для считывания BioRad QX200 Droplet Reader, измеряющем сигнал FAM/HEX, который коррелирует с концентрацией PNPLA3 или TBP. Анализ данных проводили с использованием программного пакета BioRad QuantaSoft. Образцы гейтировали по каналу (флуоресцентная метка) для определения концентрации на образец. Каждый образец затем выражали как соотношение концентрации гена, представляющего интерес (PNPLA3), и концентрации конститутивного гена (TBP) для контроля разницы в загрузке образца. Затем данные импортировали в Genedata Screener, где каждая тестируемая siRNA нормализуется по медианным значениям нейтральных контрольных лунок (содержащих только буфер). Значения IC₅₀ представлены в табл. 7.

Таблица 7
Анализ ddPCR, выполненный на первичных гепатоцитах

Дуплекс №	IC ₅₀ (мкМ)	% нокдауна PNPLA3
D-2068	.0339	-49,628
D-2069	.00408	-52,997
D-2070	.00433	-42,193
D-2072	.00884	-53,16
D-2073	> 2,0	-7,435
D-2078	.0044	-43,123
D-2084	0,00499	-38,791
D-2085	0,00539	-64,312
D-2086	> 2,0	-14,938
D-2087	> 2,0	-25,465
D-2088	0,207	-34,944
D-2089	0,0107	-38,791
D-2090	0,0218	-38,977
D-2091	0,0508	-41,209
D-2092	0,00192	-44
D-2093	0,00634	-30,233
D-2094	> 2,0	4,93
D-2095	0,00181	-59,814
D-2096	0,0181	-52,807
D-2099	0,00549	-39,296
D-2100	0,0142	-55,281
D-2158	0,0681	-48,649
D-2159	0,0325	-36,036
D-2160	> 0,667	-13,514
D-2161	> 2,0	-24,229
D-2162	0,0726	-28,634
D-2163	> 0,667	-16,3
D-2164	> 2,0	-15,418
D-2165	0,00644	-26,872
D-2166	0,00192	-30,045
D-2167	> 0,667	-6,726
D-2168	> 2,0	-15,418

047656

D-2169	> 2,0	-13,004
D-2170	> 2,0	-9,417
D-2171	0,00505	-44,395
D-2172	0,003	-55,336
D-2173	0,00598	-46,188
D-2174	> 2,0	-9,009
D-2175	0,017	-27,928
D-2176	0,00452	-35,426
D-2177	> 2,0	4,5
D-2178	> 2,0	1,8
D-2179	> 2,0	-6,306
D-2180	0,00546	-40,969
D-2181	0,00152	-43,119
D-2182	0,00317	-54,128
D-2183	0,00232	-53,211
D-2184	0,0109	-50,459
D-2185	> 2,0	-7,339
D-2186	0,0021	-48,624
D-2187	> 2,0	-11,009
D-2188	> 2,0	1,32
D-2191	0,0984	-66,923
D-2192	0,124	-64,231
D-2193	0,138	-60,606
D-2194	0,0478	-54,182
D-2195	0,0801	-47,515
D-2199	0,0517	-62,973
D-2201	0,0165	-72,404
D-2202	0,00946	-49,459
D-2203	0,0241	-58,545
D-2204	0,0382	-45,576
D-2205	0,0222	-50,946
D-2206	0,0459	-46,081
D-2209	0,0867	-46,622
D-2212	0,358	-60

047656

D-2216	0,0826	-58,942
D-2218	0,0242	-63,462
D-2220	0,0113	-69,333
D-2221	0,138	-55,541
D-2224	0,0198	-66,486
D-2225	0,245	-68,077
D-2228	0,155	-44,606
D-2229	0,0651	-38,909
D-2231	0,0512	-56,892
D-2232	0,0678	-67,981
D-2233	0,00802	-57,182
D-2234	0,00473	-55,947
D-2235	0,00816	-62,115
D-2236	0,00245	-51,542
D-2237	0,00495	-60
D-2238	0,00561	-63,017
D-2239	0,00453	-55,537
D-2240	0,00584	-56,116
D-2241	0,00755	-54,76
D-2242	0,0137	-56,332
D-2243	0,00329	-57,118
D-2244	0,0127	-56,909
D-2245	0,00697	-58,364
D-2246	0,00713	-56,828
D-2247	0,00875	-57,797
D-2248	0,0098	-58,59
D-2249	0,00603	-57,759
D-2250	0,0105	-62,155
D-2251	0,00521	-59,914
D-2252	0,00988	-58,678
D-2253	0,00481	-57,118
D-2254	0,00721	-56,332
D-2255	0,00788	-52,838
D-2256	0,00831	-55,455

047656

D-2257	0,00503	-54,545
D-2258	0,00626	-54,545
D-2259	0,00401	-55,947
D-2260	0,00379	-52,423
D-2261	0,00151	-54,31
D-2262	0,00292	-53,448
D-2263	0,00607	-59,483
D-2264	0,00703	-59,504
D-2265	> 4,0	-20,524
D-2266	0,0129	-32,727
D-2267	0,107	-27,273
D-2275	0,00359	-45,701
D-2276	0,00416	-43,891
D-2277	0,00218	-49,14
D-2278	0,00743	-42,986
D-2279	0,0116	-53,846
D-2280	0,00347	-36,652
D-2281	0,0134	-37,557
D-2282	0,00864	-34,842
D-2283	0,00738	-49,558
D-2284	0,0202	-38,053
D-2285	0,00543	-45,487
D-2286	0,00934	-47,611
D-2287	0,00652	-55,575
D-2288	0,0259	-61,593
D-2289	0,00549	-53,805
D-2290	0,00476	-51,062
D-2291	0,0105	-42,584
D-2292	0,0059	-45,455
D-2293	0,0117	-45,646
D-2294	0,0109	-52,823
D-2295	0,01246 +/- 0,015	-59,847 +/- 15,2
D-2296	0,0279	-41,346
D-2297	0,00529	-55,926

047656

D-2298	0,00838	-35,577
D-2299	0,00832	-40,865
D-2300	0,00371	-40,096
D-2301	0,00563	-38,365
D-2302	0,00639	-40,385
D-2303	0,00669	-41,25
D-2304	0,00212	-38,462
D-2305	0,00573	-37,736
D-2306	0,0645	-33,962
D-2307	0,00232	-33,019
D-2308	0,00181	-31,132
D-2309	0,0447	-45,283
D-2310	0,00655	-42,453
D-2311	0,00613	-41,509
D-2312	0,00941	-50
D-2313	0,0218	-41,784
D-2314	0,0142	-42,723
D-2315	0,0182	-31,455
D-2316	> 4,0	-23,005
D-2317	0,0228	-37,089
D-2318	0,00809	-45,352
D-2319	0,0165	-44,601
D-2320	0,0184	-38,373
D-2321	0,00766	-41,627
D-2322	0,00815	-46,507
D-2323	0,0168	-48,325
D-2324	0,00663	-62,254
D-2325	0,00716	-39,367
D-2326	0,044	-52,036
D-2327	0,00282	-65,701
D-2328	0,00411	-53,991
D-2329	0,012	-48,357
D-2330	0,019	-42,593
D-2331	0,00448	-47,418
D-2332	0,00944	-37,327
D-2333	0,00514	-37,327
D-2334	0,154	-38,249
D-2335	0,0089	-40,092
D-2336	0,0169	-48,148
D-2337	0,00274	-46,296
D-2338	0,0225	-42,723
D-2339	0,00222 +/- 0,00136	-43,218 +/- 4,81
D-2340	0,0136	-56,561
D-2341	0,0222	-50,226
D-2342	0,0273	-55,385
D-2343	0,0164	-41,784
D-2344	0,0314	-60,282
D-2345	0,0103	-65,1
D-2346	0,0427	-63,9
D-2347	0,00446	-49,4
D-2348	0,113	-53,4
D-2349	0,0176	-56,3
D-2350	0,00467	-49,4

Пример 4. Скрининг эффективности выбранных молекул siRNA PNPLA3 на модели гуманизированной мыши.

Аденоассоциированный вирус (AAV; серотип AAV8 или AAV7; свободный от эндотоксинов, получаемый в лаборатории компании Amgen), разведенный в фосфатно-буферном солевом растворе (Thermo Fisher Scientific, 14190-136) до уровня, не превышающего 4×10^{11} - 1×10^{12} вирусных частиц на животное, вводили внутривенно в хвостовую вену самцам мышей C57BL/6NCrl (Charles River Laboratories Inc.) для стимуляции экспрессии либо PNPLA3^{WT} (PNPLA3-WT), PNPLA3^{rs738409} (PNPLA3-I148M) человека, либо PNPLA3^{rs738409-rs738408} (PNPLA3-I148M DM) в печени. Возраст мышей в среднем составлял 10-12 недель и в группу включали n=4-6 животных. Каждая стадия скрининга включала как минимум две контрольные группы, которым вводили среду-носитель: пустой вектор на основе AAV и AAV-PNPLA3^{WT} или PNPLA3^{rs738409} и PNPLA3^{rs738409-rs738408}, обработанный средой-носителем. Все siRNA проверяли на функциональность в отношении AAV-PNPLA3^{WT}, PNPLA3^{rs738409} и/или PNPLA3^{rs738409-rs738408}. Через две недели после инъекции AAV мышей обрабатывали путем введения однократной дозы siRNA D-2324 (0,5 мМ) посредством подкожной инъекции в дозе 0,5, 1,0, 3,0 или 5,0 мг на 1 кг животного, разведенной в фосфатно-буферном солевом растворе (Thermo Fisher Scientific, 14190-136). В дни 8, 15, 22, 28 или 42 после инъекции siRNA у животных отбирали ткани печени, быстро замораживали их в жидком азоте, обрабатывали для выделения очищенной РНК с использованием прибора QIAcube HT (Qiagen, 9001793) и набора RNeasy 96 QIAcube HT (Qiagen, 74171) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали с использованием системы QIAxpert (Qiagen, 9002340). РНК обрабатывали ДНКазой RQ1, свободной от РНКаз (Promega, M6101), и подготавливали для Real-Time qPCR (количественной ПЦР в режиме реального времени) с использованием набора RNA-to-CT™ 1-Step kit TaqMan™ (Applied Biosystems, 4392653). Real-Time qPCR проводили на приборе QuantStudio Real-Time PCR. Результаты вычисляли, исходя из экспрессии PNPLA3 человека, нормализованной к Gapdh мыши (наборы TaqMan™ от Invitrogen, hs00228747_m1 и 4352932E соответственно), и их представляли в виде относительного нокдаун экспрессии мРНК PNPLA3 человека по сравнению с контрольными животными, которым вводили среду-носитель. Для сравнения определяли эндогенную экспрессию гена Pnpla3 мыши (Invitrogen, Mm00504420_m1).

Для анализа содержания триглицеридов в печени гомогенизировали примерно 0,05-0,1 мг замороженной печени, отобранной у животного, в 1 мл изопропанола. После 1 ч инкубации на льду образцы центрифугировали при 10000 об/мин в микроцентрифуге и супернатанты переносили в чистый 96-луночный планшет с глубокими лунками. Содержание триглицеридов определяли с использованием колориметрического реагента Infinity Triglyceride Reagent (Thermo Fisher Scientific, TR22421) и Triglyceride Standard (Pointe Scientific, T7531-STD) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты представлены в виде миллиграммов триглицеридов на миллиграммы ткани.

Фиг. 1A-1D. Пример пяти молекул siRNA, которые подвергали скринингу в отношении как дозозависимого нокдаун мРНК, так и функциональной стабильности *in vivo*. Мышей, экспрессирующих PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека, обрабатывали siRNA через две недели после внутривенных инъекций AAV. N=6 мышей на группу; данные представлены в виде среднего значения и стандартной погрешности среднего. (A) siRNA вводили в дозе 0,5, 1,0, 3,0 или 5,0 мг на 1 кг веса тела подкожно в область живота мыши. Через четыре недели после обработки с помощью siRNA мышей умерщвляли, а ткани печени отбирали и подвергали обработке для анализа экспрессии генов. Данные представляют усредненный относительный нокдаун PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека в каждой группе мышей по сравнению с контрольной группой, обработанной средой-носителем. (B) Ткани печени, отобранные из той же группы, получавшей лечение в течение четырех недель, также подвергали обработке для определения содержания триглицеридов с целью оценки функциональной эффективности средства. Данные представляют усредненное содержание триглицеридов, выраженное в миллиграммах на грамм ткани, подвергнутой обработке. (C) siRNA вводили в дозе 1,0 и 3,0 мг на 1 кг веса тела подкожно в области живота животным из параллельной когорты. У мышей отбирали ткани через шесть недель после введения siRNA для сравнения стабильности молекул siRNA *in vivo*. Печень собирали и подвергали обработке для анализа экспрессии генов. Данные представляют усредненный относительный нокдаун PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека в каждой группе мышей по сравнению с контрольной группой, обработанной средой-носителем. (D) Ткани печени, выделенные из той же группы, получавшей лечение в течение шести недель, также подвергали обработке для определения содержания триглицеридов с целью оценки функциональной эффективности средства с течением времени. Данные представляют усредненное содержание триглицеридов, выраженное в миллиграммах на грамм ткани, подвергнутой обработке.

Данные для относительного нокдаун приведены в табл. 8-12 и показывают относительный нокдаун в дни 8, 15, 22, 28 и 42 соответственно и разные дозы. Нокдаун PNPLA3 выражен в процентной доле с отрицательными значениями, указывающими на снижение уровней PNPLA3.

Таблица 8

День 8, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животнос	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-91,51
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-92,64
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-79,21
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-86,38
D-2068	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-34,15
D-2069	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-82,74
D-2070	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-79,64
D-2071	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-48,80
D-2071	PNPLA3-WT	4,00E+11	5	-59,43
D-2075	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-79,10
D-2075	PNPLA3-WT	4,00E+11	5	-60,60
D-2079	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-50,08
D-2072	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-44,40
D-2072	PNPLA3-WT	4,00E+11	5	-43,75
D-2077	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-28,46
D-2076	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-83,25
D-2078	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-49,10
D-2078	PNPLA3-WT	4,00E+11	5	-3,45
D-2073	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-39,42
D-2074	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-46,68
D-2074	PNPLA3-WT	4,00E+11	5	-5,11

047656

D-2084	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-87,49
D-2084	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-88,75
D-2084	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-16,49
D-2084	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-15,42
D-2085	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-77,14
D-2085	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-84,42
D-2085	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-25,19
D-2085	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-21,14
D-2086	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-64,54
D-2086	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-52,95
D-2087	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-20,15
D-2088	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-47,18
D-2088	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-66,96
D-2089	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-85,47
D-2089	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-21,01
D-2089	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-34,21
D-2089	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-90,55
D-2090	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-89,58
D-2090	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-50,13
D-2090	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	8,76
D-2091	PNPLA3-WT	8,00E+11	5	-35,70
D-2092	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-92,34
D-2092	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-51,35
D-2092	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-42,88
D-2093	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-83,87
D-2094	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-70,12
D-2095	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-29,95
D-2095	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	67,40
D-2095	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-85,42
D-2096	PNPLA3-WT	8,00E+11	5	-90,44
D-2081	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	6,25
D-2081	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-11,81
D-2097	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-87,61
D-2098	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-79,84

D-2099	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-84,36
D-2100	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-79,67
D-2101	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-89,64
D-2102	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-61,49
D-2103	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-19,65
D-2104	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-79,70
D-2104	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-82,87
D-2105	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-84,49
D-2105	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-87,71
D-2152	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-39,35
D-2153	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-79,04
D-2154	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-66,72
D-2155	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-44,68
D-2156	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-84,72
D-2157	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-17,25
D-2280	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-99,70
D-2280	PNPLA3 WT	1,00E+12	5	-51,13
D-2295	PNPLA3 WT	1,00E+12	5	35,90
D-2295	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-94,68
D-2296	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-23,24
D-2296	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-92,78
D-2297	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	43,71
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-94,59
D-2324	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	6,53
D-2324	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-97,39
D-2326	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-8,25
D-2326	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-77,82
D-2328	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-2,12
D-2328	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-92,49

Таблица 9

День 15, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-87,58
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-93,96

047656

D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-81,73
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-72,99
D-2131	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-66,02
D-2186	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-87,67
D-2089	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-95,01
D-2104	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-76,01
D-2105	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-72,67
D-2123	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-56,93
D-2128	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-37,26
D-2138	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-62,16
D-2149	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-72,34
D-2156	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-75,81
D-2259	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-79,15
D-2260	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-69,97
D-2261	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-50,40
D-2262	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-84,36
D-2263	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-77,08
D-2264	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-40,86
D-2269	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-37,55
D-2270	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-77,42
D-2271	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-26,87
D-2272	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-56,05
D-2280	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-86,30
D-2287	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,73
D-2289	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,48
D-2292	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-82,48
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-72,61
D-2322	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-32,92
D-2324	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-87,56
D-2327	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-86,70
D-2345	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-83,48
D-2346	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-75,93
D-2347	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-22,83
D-2348	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-20,09

047656

D-2349	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-67,70
D-2350	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-57,51
D-2351	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-56,11
D-2352	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,21
D-2353	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-89,55
D-2354	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,21
D-2358	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,10
D-2359	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,17
D-2360	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-63,98
D-2361	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,47
D-2362	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,10
D-2364	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,31
D-2370	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,99
D-2370	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	11,88
D-2371	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,14
D-2372	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,71
D-2373	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-73,80
D-2374	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-75,98
D-2375	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,68
D-2376	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,78
D-2377	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,88
D-2378	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,60
D-2379	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,73
D-2380	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,73
D-2381	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-76,24
D-2382	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-80,33
D-2383	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-71,98
D-2384	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-87,24
D-2385	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-78,77
D-2386	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-70,58
D-2387	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-67,09
D-2390	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,97
D-2391	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,10
D-2392	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,14

D-2395	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,63
D-2396	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,63
D-2397	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,90
D-2398	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,48
D-2399	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,40
D-2400	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,55
D-2401	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,98
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,25
D-2403	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	36,90
D-2404	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,08
D-2405	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,93
D-2406	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	28,80
D-2395	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-17,25
D-2396	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,70
D-2413	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,80
D-2415	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,95
D-2418	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,45
D-2419	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	43,72
D-2453	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-81,33
D-2454	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-83,38
D-2455	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-68,85
D-2456	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-89,03
D-2460	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-68,65
D-2461	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-47,85

Таблица 10

День 22, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-74,61
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-85,78
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-27,78
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-33,60
D-2324	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-56,68
D-2324	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-88,02
D-2089	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-80,86
D-2104	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-65,61
D-2105	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-39,67
D-2280	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-84,12
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-58,01
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-76,43
D-2352	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-92,74
D-2353	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-84,54
D-2354	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-89,06
D-2355	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-95,53
D-2356	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-94,99
D-2357	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-97,37

День 28, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-72,57
D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-82,74
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-32,93
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-55,31
D-2089	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-63,49
D-2104	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-44,39
D-2105	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-39,80
D-2370	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-89,28
D-2400	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,23
D-2401	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,95
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-50,65
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-69,37
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,43
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,44
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,52
D-2404	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,67
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-68,83
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-76,88
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,53
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,95

047656

D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-89,66
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,25
D-2420	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,93
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-50,01
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-66,30
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,99
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-80,05
D-2421	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-36,65
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,08
D-2425	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-16,07
D-2426	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-37,54
D-2427	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-25,19
D-2428	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-16,71
D-2437	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,78
D-2438	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,63
D-2439	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,10
D-2440	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,25
D-2441	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,13
D-2442	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-57,24
D-2443	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,43
D-2444	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,58
D-2445	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-84,55
D-2446	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-81,50
D-2427	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,09
D-2462	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-89,20
D-2463	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-41,25
D-2464	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-60,53
D-2465	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,35
D-2466	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,68
D-2467	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,15
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-46,58
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-74,47
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,79
D-2472	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-23,16

D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,54
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-57,95
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-71,96
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,70
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,94
D-2473	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-18,70
D-2675	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-25,9
D-2677	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-3,807
D-2678	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-31,76
D-2679	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,48
D-2680	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-56,44
D-2681	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-35,71
D-2682	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-71,43
D-2683	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-68,62
D-2685	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-29,93
D-2687	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-75,05
D-2689	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-81,12
D-2690	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-79,08
D-2694	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-4,531
D-2695	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	29,23
D-2668	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-65,16
D-2669	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-78,36
D-2670	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-56,05
D-2671	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-56,87

Таблица 12

День 42, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-57,74
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-83,75
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-71,07
D-2419	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-70,8
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-62,21
D-2421	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-80,12
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-60,54
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-74,77
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-54,55
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-81,13

Пример 5. Предотвращение возникновения и спасение от NAFLD путем применения молекул siRNA в гуманизированной модели мыши с PNPLA3^{rs738409-rs738408}.

Модель NAFLD/NASH "Американский синдром ожирения, вызванный образом жизни", или модель ALIOS была разработана путем скормливания мышам рациона с высоким содержанием транс-жиров (45% от общего количества жира) и сахара (Tetri 2008). Для этих исследований самцам мышей линии C57BL/6NCrl (Charles River Laboratories Inc.) возрастом от восьми до десяти недель вводили пустой вектор AAV или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, как описано ранее. Во время инъекции AAV мышам либо содержали на нормальном корме, либо им скормливали рацион ALIOS (Envigo, TD.06303) в сочетании с питьевой водой, дополненной смесью из 55% фруктозы и 45% глюкозы (Sigma, F0127 и G7021 соответственно), до отбора тканей. В предыдущих экспериментах было установлено, что сверхэкспрессия PNPLA3^{rs738409-rs738408} в данном контексте как ускоряет, так и ухудшает фенотипы NAFLD (данные не показаны).

Через две недели после инъекции AAV и начала скормливания указанного рациона мышам обрабатывали путем подкожной инъекции однократной дозы siRNA D-2324 (0,5 мМ), разведенной в фосфатно-буферном солевом растворе (Thermo Fisher Scientific, 14190-136), в дозе 5,0 мг на 1 кг животного, либо среды-носителя в качестве контроля. Введение дозы повторяли каждые две недели до отбора тканей. К

моменту отбора тканей регистрировали вес тела, затем собирали сыворотку крови путем пункции сердца под анестезией изофлураном, после чего регистрировали показатели веса печени. Срединную долю фиксировали с помощью 10% нейтрального забуференного формалина с последующей обработкой и заливкой парафином. Остаток печени быстро замораживали для анализа содержимого и экспрессии генов, как было описано ранее.

Быстрозамороженную ткань печени обрабатывали для анализа экспрессии РНК и генов, как это было описано ранее. Результаты представлены как для необработанного значения Ct, так и для относительной экспрессии мРНК указанного гена, нормализованной по отношению к Gapdh мыши. (Анализы TaqMan™ от Invitrogen: PNPLA3 человека, hs00228747_m1; Pnpla3 мыши, Mm00504420_m1; Gapdh мыши, 4352932E).

Фиксированные в формалине ткани обрабатывали для окрашивания гематоксилином и эозином (Dako, CS70030-2, CS70130-2 соответственно) в соответствии с инструкциями производителя. Балльную оценку стеатоза и воспаления проводил сертифицированный патолог.

Анализ сыворотки крови включал анализ содержания TIMP1, биомаркера, ассоциированного с NASH, и фиброза, связанного с NASH (Youssani 2011). ELISA TIMP1 (R&D Systems, M™100) проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Фиг. 2А-2G. Для оценки способности молекулы siRNA D-2324, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать развитие фенотипов, ассоциированных с NAFLD и сверхэкспрессией PNPLA3^{rs738409-rs738408}, мышам вводили пустой вектор (EV) AAV8, или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, или среду-носитель и их содержали на стандартном корме или переводили на рацион ALIOS. Через две недели после инъекций AAV мышам обрабатывали siRNA или средой-носителем раз в две недели в течение шести недель; в общей сложности проводили три цикла инъекций. У мышам отбирали ткани в момент времени восемь недель. Результаты представлены в виде усредненного значения по группе и стандартной погрешности, при N=8 на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Соотношение веса печени (грамм) и веса тела (грамм) на момент отбора тканей. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, **=0,0018, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (В) Подтверждение экспрессии и сайленсинга мРНК PNPLA3 человека в печени с помощью qPCR. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение групп, которым скармливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (С) Анализ экспрессии мРНК Pnpla3 мыши в печени с помощью qPCR указывает на то, что уровень экспрессии эндогенного Pnpla3 существенно не изменяется при сверхэкспрессии, опосредованной AAV, или при сайленсинге, индуцированном siRNA. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение группы со стандартным рационом без AAV с группами, которым скармливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (D) Содержание триглицеридов в печени представлено в миллиграммах триглицеридов на 1 г ткани печени. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, *=0,0393, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0063. (E) Уровни TIMP1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (F) Гистологический признак стеатоза по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0012. (G) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001.

Фиг. 3А-3G. Для оценки способности молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать дальнейшее прогрессирование заболевания, опосредованного PNPLA3^{rs738409-rs738408}, после начала заболевания мышам вводили пустой вектор (EV) AAV8, или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, или среду-носитель, и их содержали на стандартном корме или переводили на рацион ALIOS. Через восемь недель после инъекций AAV и изменений рациона мышам обрабатывали siRNA или средой-носителем, раз в две недели в течение дополнительных восьми недель; в общей сложности проводили четыре цикла инъекций. У мышам отбирали ткани в момент времени шестнадцать недель. Хотя не наблюдали каких-либо изменений в стеатозе, если обработку с использованием siRNA начинали после индукции заболевания, некоторые другие конечные эффекты, ассоциированные с заболеванием, были значительно снижены. Результаты представлены в виде усредненных значений и стандартной по-

грешности, при $N=8$ на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Соотношение веса печени (грамм) и веса тела (грамм) на момент отбора тканей. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, $****<0,0001$, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $***=0,0006$. (В) Подтверждение экспрессии и сайленсинга мРНК PNPLA3 человека в печени с помощью qPCR. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gαrdh мыши; сравнение групп, которым скармливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (С) Анализ экспрессии мРНК Pnpla3 мыши в печени с помощью qPCR указывает на то, что уровень экспрессии эндогенного Pnpla3 существенно не изменяется при сверхэкспрессии, опосредованной AAV, или при сайленсинге, индуцированном siRNA. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gαrdh мыши; сравнение группы со стандартным рационом без AAV с группами, которым скармливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (D) Содержание триглицеридов в печени представлено в миллиграммах триглицеридов на грамм ткани печени. Скорректированные Р-значения: AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $*=0,0403$. (E) Уровни TIMP1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, $****<0,0001$, AAV-EV+среда-носитель, $**=0,0027$, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $**=0,002$. (F) Гистологический признак стеатоза по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, $****<0,0001$, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, не значимо. (G) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, $****<0,0001$, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $**=0,0068$.

Фиг. 4А-4D. Для оценки способности молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, спастись ассоциированные с заболеванием фенотипы, обусловленные сверхэкспрессией PNPLA3^{rs738409-rs738408}, проводили сравнение печени и сыворотки крови, полученные от мышей, которым скармливали рацион ALIOS, которых в течение восьми недель обрабатывали AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408} со средой-носителем, с образцами печени и сыворотки крови мышей с AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, которым скармливали рацион ALIOS, которым в течение шестнадцати недель вводили siRNA. Хотя к данному моменту времени обработки с использованием siRNA не наблюдали каких-либо изменений в стеатозе, уровни триглицеридов в печени, TIMP1 в сыворотке крови и воспаление были статистически ниже на момент времени шестнадцать недель по сравнению с контрольными группами на момент времени восемь недель, которым вводили среду-носитель. Результаты представлены в виде усредненных значений и стандартной погрешности, при $N=8$ на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты, которой в течение восьми недель вводили AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408} со средой-носителем, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Содержание триглицеридов в печени представлено в миллиграммах триглицеридов на грамм ткани печени. Скорректированные Р-значения: 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не значимо; 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $**=0,0011$. (В) Уровни Timp1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не значимо; 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $*=0,0134$. (С) Гистологический признак стеатоза по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не достоверно; 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, не значимо. (D) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: 16 недель AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не значимо; 16 недель AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, $*=0,0112$.

Пример 6. Предотвращение возникновения фиброза печени путем применения молекул siRNA в гуманизированной модели мыши с PNPLA3^{rs738409-rs738408}.

Рацион "AMLN", разработанный Amylin Pharmaceuticals (Clapper 2013), представляет собой модифицированный вариант рациона ALIOS. Такая пища предусматривает уровень холестерина, повышенный в десять раз (2%), и дополнительную сахарозу. У мышей, находящихся на рационе "AMLN", через 20-30 недель развивался фиброз со степенью от легкой или умеренной (публикации Clapper, Mells and Kristiansen). Для этих исследований самцам мышей линии C57BL/6NCrl (Charles River Laboratories Inc.) возрастом от восьми до десяти недель вводили пустой вектор AAV или вектор AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, как было описано ранее, для ускорения начала заболевания. Во время инъек-

ции AAV мышей продолжали содержать на стандартном корме или им скармливали рацион Envigo TD.170748 в сочетании с питьевой водой, дополненной смесью из 55% фруктозы и 45% глюкозы (Sigma, F0127 и G7021 соответственно), до умерщвления.

Через две недели после инъекции AAV и начала скармливания указанного рациона мышей обрабатывали путем подкожной инъекции однократной дозы siRNA D-2324 (0,5 мМ), разведенной в фосфатно-буферном солевом растворе (Thermo Fisher Scientific, 14190-136) в дозе 5,0 мг на 1 кг животного, либо среды-носителя в качестве контроля. Введение дозы повторяли каждые две недели до отбора тканей. К моменту отбора тканей регистрировали вес тела, затем собирали сыворотку крови путем пункции сердца под анестезией изофлураном, после чего регистрировали показатели веса печени. Срединную долю фиксировали с помощью 10% нейтрального забуференного формалина с последующей обработкой и заливкой парафином. Остаток печени быстро замораживали для анализа экспрессии генов.

Быстрозамороженную ткань печени обрабатывали для анализа экспрессии РНК и генов, как это было описано ранее. Результаты представлены как для необработанного значения Ct, так и для относительной экспрессии мРНК указанного гена, нормализованной по отношению к *Gapdh* мыши. (Анализы TaqMan™ от Invitrogen: PNPLA3 человека, hs00228747_m1; Pnpla3 мыши, Mm00504420_m1; Colla1 мыши, Mm00801666_g1; Col3a1 мыши, Mm01254471_g1; Col4a1, Mm01210125_m1; *Gapdh* мыши, 4352932E). Colla1, Col3a1 и Col4a1 представляют собой маркеры внеклеточного матрикса, связанные с активацией звездчатых клеток печени и фиброзом печени (Baicocchini 2016).

Фиксированные в формалине ткани обрабатывали для окрашивания гематоксилином, эозином и трихромом Массона (Dako, CS70030-2, CS70130-2, AR17311-2 соответственно) в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание актина гладких мышц выполняли без демаскировки антигена и с использованием устройства для автоматического окрашивания DAKO. Срезы обрабатывали с использованием пероксидазы-1 и Sniper (Bioscare, PX968 и BS966 соответственно) и окрашивали моноклональными антителами к альфа-актину гладких мышц (Sigma, F3777), затем кроличьим антителом к FITC (Invitrogen, 711900), полимером Envision-Rabbit HRP (Dako, K4003), DAB+ (Dako, K3468) и гематоксилином. Оценку степени стеатоза, воспаления, гиперплазии овальных клеток/желчных протоков и количества αSMA-положительных клеток проводил сертифицированный патолог.

Проводили анализ сыворотки крови на содержание TIMP1 мыши (R&D Systems, M™100) и мышечного цитокератина 18-M30 (Cusabio, CSB-E14265m) в соответствии с инструкциями производителя. В дополнение к TIMP1 цитокератин 18-M30 был идентифицирован как потенциальный биомаркер NAFLD/NASH, в том числе раннего фиброза (Neuman 2014 и Yang 2015).

Фиг. 5A-5L. Для оценки способности молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать развитие раннего фиброза, мышам вводили пустой вектор (EV) AAV8, или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, или среду-носитель, и их содержали на стандартном корме или переводили на рацион AMLN. Через две недели после инъекций AAV мышей обрабатывали siRNA D-2324 или средой-носителем раз в две недели в течение шести недель; в общей сложности проводили шесть циклов инъекций. У мышей отбирали ткани в момент времени десять недель. Результаты представлены в виде усредненных значений и стандартной погрешности, стандартный корм без AAV+среда-носитель и корм AMLN с вектором AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, N=8 на группу; рацион AMLN с вектором AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и с вектором AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, N=12 на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты, которую обрабатывали AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408} со средой-носителем, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (A) Соотношение веса печени (грамм) и веса тела (грамм) на момент отбора тканей. Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001.

(B) Подтверждение экспрессии и сайленсинга мРНК PNPLA3 человека в печени с помощью qPCR. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к *Gapdh* мыши; сравнение групп PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (C) Анализ экспрессии мРНК Pnpla3 мыши в печени с помощью qPCR указывает на то, что уровень экспрессии эндогенного Pnpla3 существенно не изменяется при сверхэкспрессии, опосредованной AAV, или при сайленсинге, индуцированном siRNA. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к *Gapdh* мыши; сравнение группы со стандартным рационом без AAV с группами, которым скармливали рацион AMLN, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (D) Уровни Timp1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (E) Уровни CK18m30 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (F) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, вы-

ражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, *=0,0108, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (G) Гистологический признак гиперплазии овальных клеток/желчных протоков по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, оцениваемый как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0081. (H) Иммуногистохимическое окрашивание антителом к актину гладких мышц, оцениваемое как: в пределах нормы (0), минимальное (1), легкое (2), умеренное (3) и сильно выраженное (4). Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, *=0,0101, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ***=0,0002. (I) Окрашивание трихромом Массона на фиброз, оцениваемое как: в пределах нормы (0), минимальное (1), легкое (2), умеренное (3) и сильно выраженное (4). Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (J) Экспрессия мРНК Col1a1 мышцы в печени, оцениваемая с помощью qPCR. Относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мышцы. Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (K) Экспрессия мРНК Col3a1 мышцы в печени, оцениваемая с помощью qPCR. Относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мышцы. Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (L) Экспрессия мРНК Col4a1 мышцы в печени, оцениваемая с помощью qPCR. Относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мышцы. Скорректированные P-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0005, AAV-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **<0,0041.

Пример 7. Скрининг молекул siRNA PNPLA3 с применением мышинной модели визуализации биолюминисценции.

Самцам мышей BALB/c (Charles River Laboratories Inc.) в целом возрастом 10-12 недель вводили аденоассоциированный вирус (AAV; серотип AAVDJ8; без эндотоксина, получен внутри компании Amgen), разбавленный фосфатно-солевым буферным раствором (Thermo Fisher Scientific, 14190-136). AAV вводили в количестве от 5e11 до 7,5e11 вирусных частиц на животное и вводили внутривенно путем инъекции в хвостовую вену. Конструкции на основе AAV конструировали с промотором CMV мышинного цитомегаловируса и репортерным геном люциферазы светляка, в котором на 3'-конце присутствует ряд нуклеотидов, содержащий участки либо PNPLA3^{WT} человека (эталонный аллель), либо целевые последовательности PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека (минорный аллель), и другие представляющие интерес целевые последовательности PNPLA3 человека, не охватывающие SNP, как подробно показано на фиг. 6 и 7.

Через две недели после инъекции AAV мышам путем инъекции вводили D-люциферин RediJect (PerkinElmer, 770504) в соответствии с инструкциями производителя. Биоломинесцентный сигнал у мышей определяли с применением системы визуализации спектра *in vivo* IVIS (PerkinElmer) и анализировали с применением программного обеспечения Living Image (PerkinElmer). Мышей затем рандомизировали на группы с n=5 на основании общего сигнала потока [фотоны/секунда] в области печени. После рандомизации на группы, подвергающиеся лечению, мышам вводили одну дозу siRNA (0,5 мМ), разбавленной фосфатно-солевым буферным раствором (Thermo Fisher Scientific, 14190-136). siRNA вводили путем подкожной инъекции при указанных миллиграммах на килограмм веса животного. Для каждого цикла скрининга и каждого типа AAV включали контрольную группу, обработанную средой-носителем.

Через 1, 2, 3 и 4 недели после инъекции siRNA мышей повторно визуализировали и собирали результаты измерений общей интенсивности потока [ф/с] с применением того же определенного участка, представляющего интерес, установленного для исходных данных. Для каждого животного относительный процент нокдауна определяли посредством расчета изменения интенсивности общего потока в процентах через 1, 2, 3 или 4 недели относительно общей интенсивности потока для этого животного на исходном уровне, нормализованного относительно среднего изменения общей интенсивности потока относительно исходного уровня в контрольной группе, обработанной средой-носителем, для одного и того же момента времени. Например, животное, обработанное с помощью siRNA, характеризуется относительным нокдауном, рассчитанным следующим образом: (общая интенсивность потока для животного на 2 неделе)/(общая интенсивность потока для животного на исходном уровне) с нормализацией относительно среднего значения (общая интенсивность потока для животных, обработанных средой-носителем на 2 неделе/общая интенсивность потока для животных, обработанных средой-носителем на исходном уровне). На фиг. 8 показаны иллюстративные изображения животных, которым путем инъекции вводили AAV, экспрессирующий либо целевые последовательности минорного аллеля PNPLA3 человека, либо целевые последовательности эталонного аллеля, и изменение общей интенсивности потока с течением времени как до, так и после обработки с помощью siRNA.

Анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPL A3, день 8 (%)	Нокдаун PNPL A3, день 15 (%)	Нокдаун PNPL A3, день 22 (%)	Нокдаун PNPL A3, день 29 (%)	Нокдаун PNPL A3, день 43 (%)
D-	PNPLA3-	5E+11	5	-98,03	-94,77	-94,15		-65,40
2324	I148M DM							
D-2370	PNPLA3-I148M DM	5E+11	5	-96,48	-96,52	-95,40		-69,31
D-2419	PNPLA3-I148M DM	5E+11	5	-97,66	-97,09	-96,84		-90,52
D-2324	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-96,39	-91,43	-87,71		-61,75
D-2370	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,42	-95,98	-95,51		-85,66
D-2419	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,37	-95,32	-95,52		-81,81
D-2421	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-96,13	-93,99	-95,26		-85,49
D-2404	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,77	-96,82	-96,83		
D-2402	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,69	-96,69	-96,81		-55,46
D-2472	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-95,89	-93,61	-92,05		-68,74
D-2443	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,33	-96,51	-95,82		-84,56
D-2466	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,96	-97,13	-96,75		-79,62
D-2473	PNPLA3-I148M DM	5E+11	3	-97,18	-95,95	-95,79		-68,96
D-2324	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-90,86	-82,53	-80,56		-74,32
D-2370	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-93,49	-90,34	-89,17		-56,45
D-2419	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-89,12	-84,16	-87,52		-47,52
D-2421	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-83,03	-70,41	-74,45		-26,47
D-2404	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-94,34	-91,18	-90,01		-59,48
D-2402	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-87,41	-79,59	-84,95		-32,94
D-2472	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-87,28	-79,86	-76,77		-33,42
D-2443	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-48,96	-46,63	-69,39		-34,70
D-2466	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-90,36	-83,03	-85,21		-44,20
D-2473	PNPLA3-I148M DM	5E+11	1	-80,89	-76,26	-84,45		-56,63
D-2454	PNPLA3 WT	5E+11	3	-97,89	-85,94	-92,41		-44,16
D-	PNPLA3	5E+11	3	-98,67	-90,86	-94,56		-72,71

047656

2453	WT							
D-2456	PNPLA3 WT	5E+11	3	-97,75	-84,03	-87,90		-40,07
D-2455	PNPLA3 WT	5E+11	3	-89,75	-61,34	-80,50		-38,33
D-2454	PNPLA3 WT	5E+11	1	-94,43	-73,24	-89,57		-60,76
D-2453	PNPLA3 WT	5E+11	1	-94,15	-72,63	-80,99		5,10
D-2456	PNPLA3 WT	5E+11	1	-79,90	-50,52	-69,95		-20,01
D-2455	PNPLA3 WT	5E+11	1	-71,82	-1,32	-55,65		17,39
D-2419	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-98,00	-97,61	-96,67	-91,38	
D-2666	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-94,32	-94,07	-90,69	-80,56	
D-2667	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-95,49	-94,77	-93,58	-85,70	
D-2676	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-94,63	-91,64	-89,02	-72,10	
D-2699	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3		-90,85	-85,48	-57,10	
D-2700	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,65	-96,86	-93,76	-87,13	
D-2701	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,37	-96,59	-95,00	-88,29	
D-2705	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-95,74	-91,67	-86,98	-75,38	
D-2706	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-95,51	-91,01	-85,19	-68,36	
D-2707	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-94,33	-89,29	-85,91	-66,08	
D-2708	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,72	-96,34	-95,70	-89,66	
D-2684	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-94,66	-89,59	-85,28	-55,31	
D-2686	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,29	-94,61	-89,34	-51,49	
D-2688	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-95,97	-94,43	-93,01	-82,63	
D-2691	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-94,47	-86,71	-81,93	-64,98	
D-2692	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,52	-94,01	-89,97	-80,83	
D-2696	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,94	-94,79	-92,89	-83,76	
D-	PNPLA3-	7,5E+11	3	-91,39	-83,82	-75,89	-51,50	

2697	I148M DM							
D-2419	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-95,52	-93,54	-91,46	-74,42	
D-2523	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-94,27	-91,79	-66,89	-50,87	
D-2413	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-94,04	-95,17	-76,04	-53,22	
D-2523	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-65,61	-86,75	78,32	163,55	
D-2413	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-83,37	-85,51	-26,85	-9,13	
D-2667	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-58,87	-59,41	-4,15	35,34	
D-2419	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-91,58	-90,56	-73,21	-54,90	
D-2688	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-73,57	-84,01	-37,46	-1,49	
D-2708	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-84,06	-86,91	-65,11	-62,60	
D-2669	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	1	-0,36	15,49	220,82	268,45	
D-2711	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-0,01	49,59	238,44	212,77	
D-2713	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-91,72	-90,51	-63,93	-30,60	
D-2716	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-86,43	-87,62	-53,78	-44,36	
D-2674	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-80,59	-81,95	-36,01	0,59	
D-2698	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-85,22	-71,73	483,18	807,64	
D-2693	PNPLA3-I148M DM	7,5E+11	3	-75,98	-59,22	39,49	110,57	
D-2456	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-85,45	-78,57	-73,40	-58,06	
D-2523	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-27,40	-30,01	-40,22	-49,59	
D-2413	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-36,68	-27,93	-10,77	12,54	
D-2419	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	115,08	100,96	101,39	64,16	
D-2679	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-34,16	-6,82	17,45	17,46	
D-2688	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	135,68	67,66	73,67	48,09	
D-2708	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	69,43	40,96	50,89	52,15	
D-	PNPLA3	7,5E+11	3	189,68	50,72	148,32	147,67	

047656

2669	WT							
D-2711	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	109,67	114,26	75,39	93,47	
D-2713	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	115,32	48,86	18,67	1,36	
D-2716	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	205,93	114,38	114,09	83,88	
D-2674	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	81,00	67,18	109,44	65,24	
D-2698	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	105,88	76,39	62,37	37,65	
D-2693	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	148,52	125,48	116,64	61,43	
D-2690	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	260,84	226,65	132,56	143,47	
D-2419	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-93,56	-89,52	-84,43	-63,34	
D-2717	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-80,51	-67,95	-58,97	-22,43	
D-2718	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-71,69	-55,51	-36,08	38,24	
D-2721	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-63,71	-62,50	-48,52	-12,97	
D-2719	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-78,95	-70,97	-65,38	-13,45	
D-2713	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-70,43	-64,51	-43,23	-0,48	
D-2712	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-79,63	-68,64	-51,82	-8,94	
D-2720	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-65,95	-86,70	-40,92	2,24	
D-2722	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-80,32	-75,04	-63,28	-34,56	
D-2723	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-72,69	-55,59	-39,98	35,01	
D-2724	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-87,97	-78,29	-73,04	-42,89	
D-2725	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-79,65	-70,69	-32,50	-35,65	
D-2726	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	-40,03	-38,86	-14,74	55,71	
D-2716	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	1	34,75	92,81	181,00	440,62	
D-2454	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-98,16	-95,32	-90,10	-88,50	
D-2523	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-44,09	-18,41	133,97	45,50	
D-	PNPLA3	7,5E+11	3	-64,12	-40,89	38,07	-3,05	

047656

2413	WT							
D-2717	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-47,67	-19,71	109,49	42,75	
D-2718	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-77,04	-60,05	-3,84	-40,18	
D-2721	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-47,41	-49,33	10,37	-41,12	
D-2719	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-29,15	-27,68	72,52	-20,99	
D-2720	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-67,46	-46,37	66,09	-20,66	
D-2726	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-83,36	-81,38	-37,21	-61,84	
D-2723	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-76,09	-57,32	-7,17	-45,85	
D-2419	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,66	-97,62	-93,93	-88,77	
D-2765	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,64	-97,81	-95,29	-87,53	
D-2766	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,30	-98,15	-95,74	-90,07	
D-2724	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,41	-97,40	-94,77	-74,92	
D-2768	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-93,09	-95,62	-90,36	-74,62	
D-2769	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,94	-97,93	-95,17	-89,60	
D-2770	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-89,23	-94,14	-90,41	-79,60	
D-2771	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,22	-97,80	-95,95	-90,02	
D-2772	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,47	-97,84	-95,09	-92,03	
D-2773	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,51	-97,95	-96,18	-93,12	
D-2774	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,78	-97,86	-95,36	-91,98	
D-2413	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-97,94	-98,01	-96,24	-91,62	
D-2419	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-95,82	-97,64	-93,55	-89,59	
D-2717	PNPLA3- I148M DM	7,5E+11	3	-96,64	-97,39	-95,19	-90,49	
D-2453	PNPLA3 WT	7,5E+11	1,5	-94,74	-92,67	-88,92	-82,19	
D-2724	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	20,64	74,00	49,42	77,34	
D-	PNPLA3	7,5E+11	3	-27,08	53,78	58,28	17,26	

2522	WT							
D-2765	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-65,40	-34,32	-35,49	-46,32	
D-2766	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-11,64	30,74	34,37	27,78	
D-2767	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	14,66	60,91	75,79	39,35	
D-2768	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	50,61	196,44	345,66	149,29	
D-2769	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	30,51	68,93	90,25	35,98	
D-2770	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	25,01	69,81	95,00	99,26	
D-2771	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	60,93	158,57	281,70	147,49	
D-2772	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-3,32	58,08	89,41	85,72	
D-2773	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-36,28	-20,77	21,91	-22,36	
D-2774	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	2,83	51,07	71,49	65,75	
D-2413	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	-5,20	44,59	50,74	28,08	
D-2419	PNPLA3 WT	7,5E+11	3	101,03	115,15	32,98	-16,47	
D-2717	PNPLA3 WT	7,5E+11	1,5	21,80	107,39	173,59	87,94	

Пример 8. Подтверждение эффективности PNPLA3^{rs738409-rs738408}-селективной молекулы siRNA на модели печени химерной гуманизированной мыши.

Для оценки эффективности siRNA, селективной в отношении минорного аллеля PNPLA3 человека, в гепатоцитах *in vivo* применяли печень химерных гуманизированных мышей PXB от PhoenixBio Co., Ltd (Japan) (Miyamoto et al. (2017), *Xenobiotica*, 47(12):1052-1063; Tateno et al. (2015), *PLoS One*, 10(11):e0142145. doi: 10.1371/journal.pone.0142145). На момент начала исследования возраст самцов мышей составлял примерно четыре месяца; по меньшей мере три месяца после трансплантации. Посредством PhoenixBio определяли, что мыши характеризуются показателем замещения гепатоцитами человека, составляющим 90-95% и, на основе предыдущего генотипирования, что мыши были гетерозиготными по PNPLA3^{rs738409} (партия BD195). По прибытии мышей кормили стандартным кормом ProLab RMH 3000, как рекомендовано компанией PhoenixBio. После периода акклиматизации, составляющего одну неделю, рацион заменяли на NASH-индуцирующий рацион с высоким содержанием жиров и богатый фруктозой (Research Diets, D19021301). Через неделю на NASH-индуцирующем рационе мышей рандомизировали на основании измерений веса тела. Мышей обрабатывали путем подкожной инъекции однократной дозы siRNA (0,5 мМ), разбавленной фосфатно-солевым буферным раствором (Thermo Fisher Scientific, 14190-136), в дозе 3,0 или 10,0 мг на 1 кг веса животного, либо мыши получали только среду-носитель. Через две или четыре недели после инъекции siRNA у животных собирали ткани печени, быстро замораживали в жидком азоте, обрабатывали для выделения очищенной РНК с применением автоматизированной системы выделения и очистки ДНК/РНК QIAcube (Qiagen) и набора RNeasy Mini QIAcube (Qiagen, 74116) в соответствии инструкциями производителя. Образцы анализировали с применением спектрофотометра NanoDrop[™] 8000 (Thermo Scientific, ND-8000-GL). РНК обрабатывали ДНКазой без РНКаз RQ1 (Promega, M6101) и подготавливали для цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в соответствии с инструкциями изготовителя. Набор для синтеза 1-ой нити cDNA AccuScript High Fidelity (Thermo Fisher, 200820) применяли для осуществления реакции обратной транскрипции и ПЦР-реакции проводили с применением ddPCR Supermix for Probes (BioRad, 1863010). ddPCR проводили с применением системы для капельной цифровой ПЦР AutoDG (BioRad, QX200). Следующие анализы TaqMan[™] приобретали у Invitrogen: PNPLA3 человека (Hs00228747_m1), ASGR1 человека (Hs1005019_m1), Asgr1 мыши (Mm01245581_m1) и анализ для различения минорного/эталонного аллеля PNPLA3 rs738409 человека (C 7241 10). Следующие анализы приобретали у Integrated DNA Technologies Inc.: TBP человека (Hs.PT.53a.20105486; соотношение праймеров к зондам составляет 3.6:1), HPRT1 человека (Hs.PT.39a.22214821; соотношение праймеров к зондам составляет 3.6:1) и Hprt мыши (Mm.PT.39a.22214828; соотношение праймеров к зондам составляет 3.6:1). Результаты для PNPLA3, HPRT1 и ASGR1 человека и Hprt и Asgr1 мыши представлены в виде копий на реакцию в объеме 20 микролитров, нормализованных относительно TBP человека. Данные для PNPLA3 человека, HPRT1 человека и Hprt мыши также представлены в виде относительного процента нокдауна экспрессии мРНК по сравнению с таковым у контрольных животных, обработанных средой-носителем.

Для анализа содержания триглицеридов в печени гомогенизировали примерно 0,05-0,1 мг замороженной печени, отобранной у мышей, в 1 мл изопропанола. После одного часа инкубации на льду образцы центрифугировали при 10000 об/мин в микроцентрифуге и супернатанты переносили в чистый

96-луночный планшет с глубокими лунками. Содержание триглицеридов определяли с применением colorimetric Infinity Triglyceride Reagent (Thermo Fisher Scientific, TR22421) и Triglyceride Standard (Pointe Scientific, T7531-STD) в соответствии с инструкциями производителя, и микропланшет-ридера SpectraMax Plus с программным обеспечением SoftMax Pro6 (Molecular Devices). Результаты представлены в виде миллиграммов триглицеридов на грамм ткани печени.

На фиг. 9 показан пример молекулы siRNA, D-2419, демонстрирующий как дозозависимый, так и аллель-селективный нокдаун мРНК и функциональной эффективности *in vivo*. После одной недели на NASH-индуцирующем рационе мышей, гетерозиготных по PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека, обрабатывали с помощью siRNA или носителя. (A) Молекулу siRNA, D-2419, вводили при 3,0 и 10,0 мг на 1 кг веса тела подкожно в область живота мыши. Через две и четыре недели после обработки с помощью siRNA мышей умерщвляли, а ткани печени отбирали и подвергали обработке для анализа. С применением ddPCR и аллель-специфического реагента TaqMan® с двумя красителями для различения минорных и эталонных аллелей PNPLA3 данные демонстрируют как дозозависимый, так и аллель-селективный нокдаун PNPLA3^{rs738409-rs738408} и неизмеримое изменение для PNPLA3^{WT}. N=5 мышей на группу; данные представлены в виде среднего значения и стандартной погрешности среднего. Двухфакторный ANOVA, ** 0,001, *** < 0,001, **** < 0,0001, NS=не значимо. (B) Данные представляют собой средний относительный процент нокдауна мРНК и стандартную ошибку среднего для аллеля PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека по сравнению с PNPLA3^{WT}, установленным в контрольной группе, обработанной средой-носителем. Значения представлены относительно среднего значения для контроля, обработанного средой-носителем за две недели до анализа, при этом все значения нормализованы относительно ТВР человека. (C) Ткани печени, выделенные из группы, получавшей лечение в течение двух недель, подвергали обработке для определения содержания триглицеридов с целью оценки функциональной эффективности. Данные представляют собой миллиграммы триглицеридов на 1 г печени. N=5 мышей на группу; данные представлены в виде среднего значения и стандартной погрешности среднего. Однофакторный ANOVA, **=0,01, NS=не значимо. (D) Для контроля эффективной GalNAc-опосредованной доставки siRNA D-2787, siRNA, перекрестно реагирующую с HPRT и Hprt человека и мыши соответственно, доставляли при 10 мг на 1 кг и ткани печени собирали через две недели. Данные представляют собой копии мРНК HPRT и мРНК Hprt у мышей, обработанных с помощью D-2787 (N=4), по сравнению с мышами, обработанными средой-носителем (N=5). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной погрешности среднего. Однофакторный ANOVA, *=0,01. (E) Данные представляют собой средний относительный процент нокдауна мРНК и стандартную ошибку среднего для мРНК HPRT человека и Hprt мыши соответственно, установленные для контрольной группы, обработанной средой-носителем; все данные нормализованы относительно ТВР человека. (F) Для подтверждения экспрессии рецептора GalNAc на гепатоцитах мышей PXB® уровни мРНК Asgr1 мыши и мРНК ASGR1 человека оценивали в отсутствие и в присутствии D-2419 как через две недели, так и через четыре недели после инъекции siRNA. N=5 мышей на группу; данные представлены в виде среднего значения и стандартной погрешности среднего.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция для RNAi, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит антисмысловую последовательность SEQ ID NO: 2982 или 2618 и где конструкция для RNAi подавляет экспрессию белка 3, содержащего пататин-подобный фосфолипазный домен (PNPLA3).
2. Конструкция для RNAi по п.1, где антисмысловая нить содержит участок, который комплементарен последовательности мРНК PNPLA3.
3. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит смысловую последовательность SEQ ID NO: 2981 или 2617.
4. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где конструкция предпочтительно подавляет минорный аллель PNPLA3-rs738409.
5. Конструкция для RNAi по п.4, где конструкция по меньшей мере на 10% сильнее подавляет минорный аллель PNPLA3-rs738409, чем основной аллель.
6. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где конструкция предпочтительно подавляет минорный аллель PNPLA3-rs738408.
7. Конструкция для RNAi по п.6, где конструкция по меньшей мере на 10% сильнее подавляет два минорных аллеля PNPLA3-rs738409-rs738408, чем основной аллель.
8. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок длиной от 15 до 30 пар оснований.
9. Конструкция для RNAi по п.8, где длина дуплексного участка составляет от 17 до 24 пар оснований.
10. Конструкция для RNAi по п.8, где длина дуплексного участка составляет от 19 до 21 пары оснований.
11. Конструкция для RNAi по п.10, где длина дуплексного участка составляет 19 пар оснований.

12. Конструкция для RNAi по п.10, где длина дуплексного участка составляет 20 пар оснований.
13. Конструкция для RNAi по п.10, где длина дуплексного участка составляет 21 пару оснований.
14. Конструкция для RNAi по любому из пп.8-13, где длина каждой из смысловых нити и антисмысловых нити составляет от 15 до 30 нуклеотидов.
15. Конструкция для RNAi по п.14, где длина каждой из смысловых нити и антисмысловых нити составляет от 19 до 27 нуклеотидов.
16. Конструкция для RNAi по п.14, где длина каждой из смысловых нити и антисмысловых нити составляет от 21 до 25 нуклеотидов.
17. Конструкция для RNAi по п.14, где длина каждой из смысловых нити и антисмысловых нити составляет от 21 до 23 нуклеотидов.
18. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-17, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один тупой конец.
19. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-17, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец из 1-4 неспаренных нуклеотидов.
20. Конструкция для RNAi по п.19, где нуклеотидный липкий конец содержит два неспаренных нуклеотида.
21. Конструкция для RNAi по п.19 или 20, где конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловых нити, 3'-конце антисмысловых нити или 3'-конце как смысловых нити, так и антисмысловых нити.
22. Конструкция для RNAi по любому из пп.19-21, где нуклеотидный липкий конец содержит динуклеотид 5'-UU-3' или динуклеотид 5'-dTdT-3'.
23. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-22, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.
24. Конструкция для RNAi по п.23, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-модифицированный нуклеотид.
25. Конструкция для RNAi по п.23, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA), гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), инвертированное основание или их комбинации.
26. Конструкция для RNAi по п.25, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид или их комбинации.
27. Конструкция для RNAi по п.23, где все нуклеотиды в смысловых и антисмысловых нитях являются модифицированными нуклеотидами.
28. Конструкция для RNAi по п.27, где модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.
29. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-28, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь.
30. Конструкция для RNAi по п.29, где конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце антисмысловых нити.
31. Конструкция для RNAi по п.29, где конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце антисмысловых нити и две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце смысловых нити.
32. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-31, где антисмысловая нить и смысловая нить состоят из SEQ ID NO: 2982 и 2981 соответственно.
33. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-31, где антисмысловая нить и смысловая нить состоят из SEQ ID NO: 2618 и 2617 соответственно.
34. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-33, где конструкция для RNAi обеспечивает снижение уровня экспрессии PNPLA3 в клетках печени после инкубации с конструкцией для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии PNPLA3 в клетках печени, которые инкубировали с контрольной конструкцией для RNAi.
35. Конструкция для RNAi по п.34, где клетки печени представляют собой клетки Hep3B или HepG2.
36. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-35, где конструкция для RNAi по меньшей мере на 10% подавляет экспрессию PNPLA3 при 5 нМ в клетках Hep3B *in vitro*.
37. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-35, где конструкция для RNAi по меньшей мере на 10% подавляет экспрессию PNPLA3 при 5 нМ в клетках HepG2 *in vitro*.
38. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-35, где конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках Hep3B со значением IC₅₀, составляющим менее 1 нМ.
39. Конструкция для RNAi по любому из пп.1-35, где конструкция для RNAi подавляет экспрессию

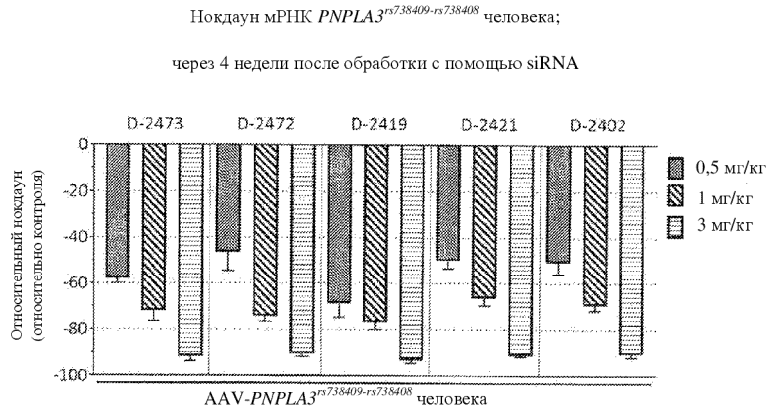
PNPLA3 в клетках HepG2 со значением IC_{50} , составляющим менее 1 нМ.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию для RNAi по любому из пп.1-39 и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

41. Применение конструкции для RNAi по любому из пп.1-39 для получения лекарственного средства для лечения заболевания печени.

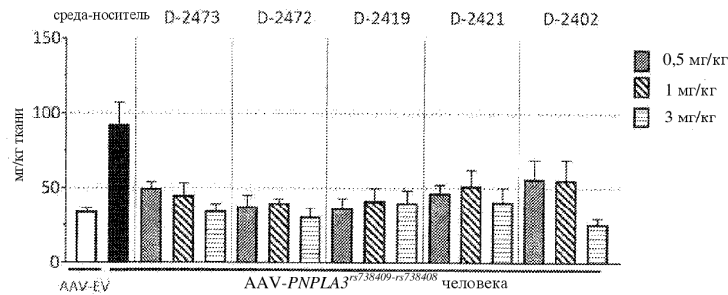
42. Применение по п.41, где уровень экспрессии PNPLA3 в гепатоцитах снижается после введения конструкции для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии PNPLA3 у пациента, не получающего конструкцию для RNAi.

43. Применение по п.41, где заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD) или неалкогольный стеатогепатит (NASH).



Фиг. 1А

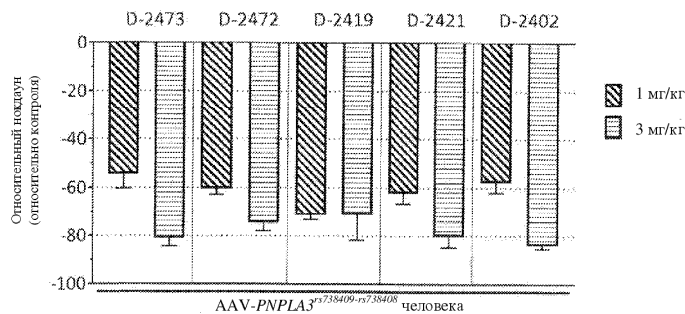
Содержание печеночных триглицеридов; через 4 недели после обработки с помощью siRNA



Фиг. 1В

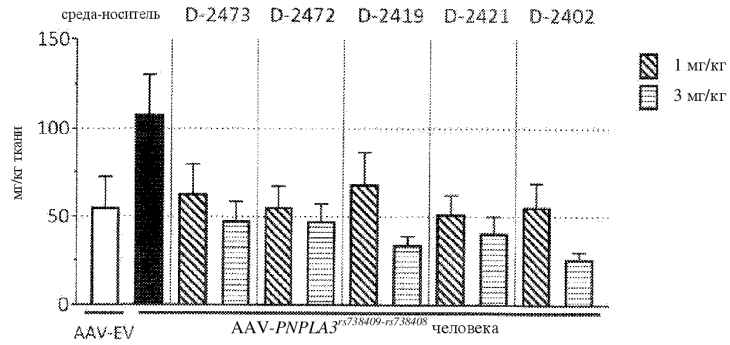
Нокдаун мРНК *PNPLA3*^{rs738409-rs738408} человека;

через 6 недель после обработки с помощью siRNA

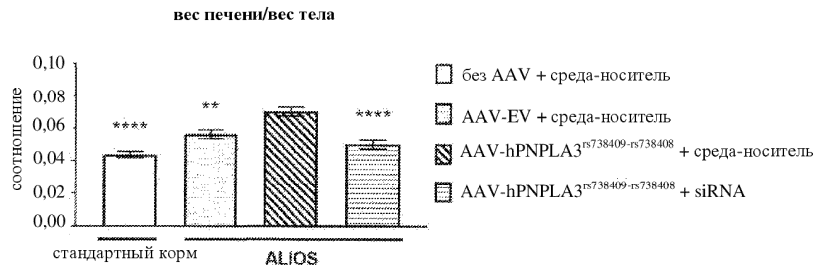


Фиг. 1С

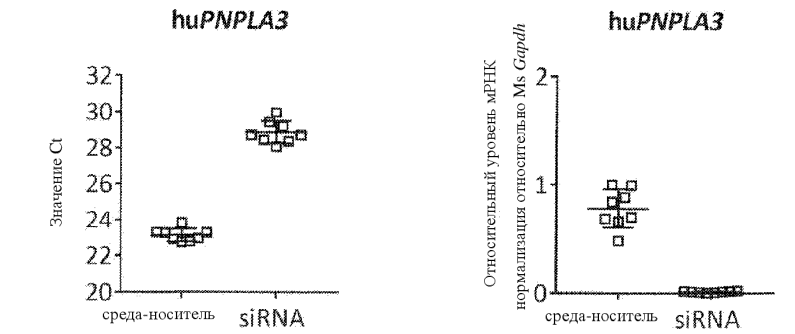
Содержание печеночных триглицеридов; через 4 недели после обработки с помощью siRNA



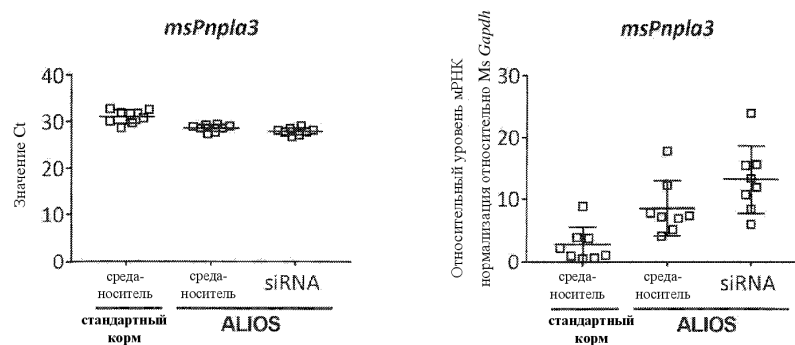
Фиг. 1D



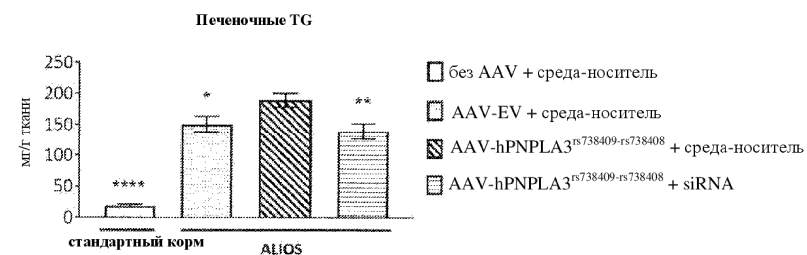
Фиг. 2A



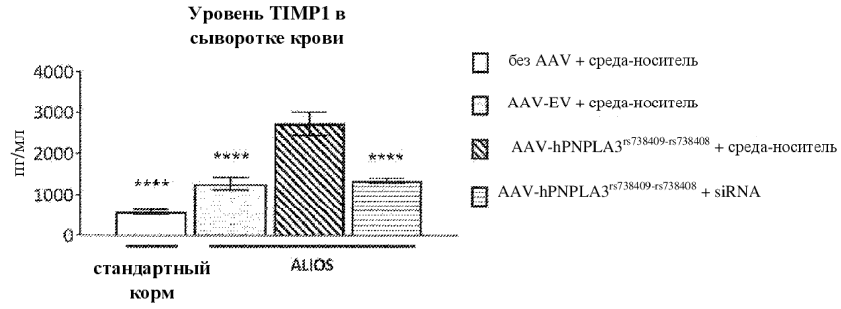
Фиг. 2B



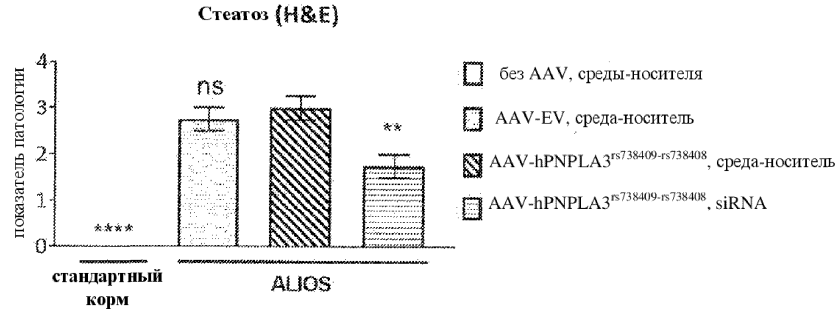
Фиг. 2C



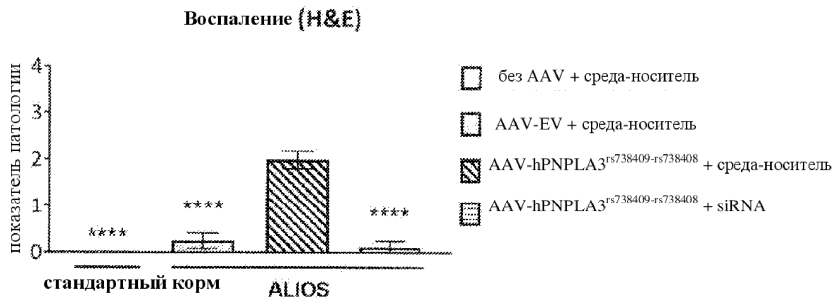
Фиг. 2D



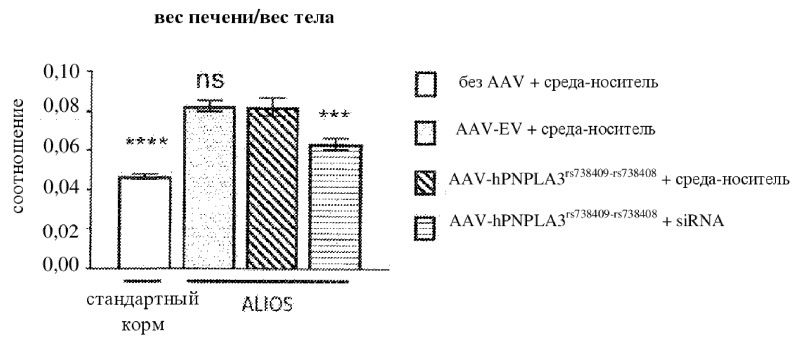
Фиг. 2E



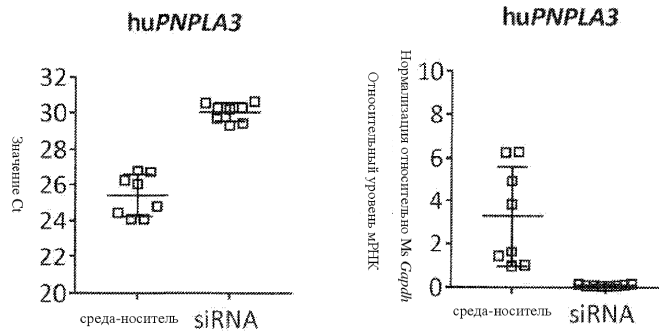
Фиг. 2F



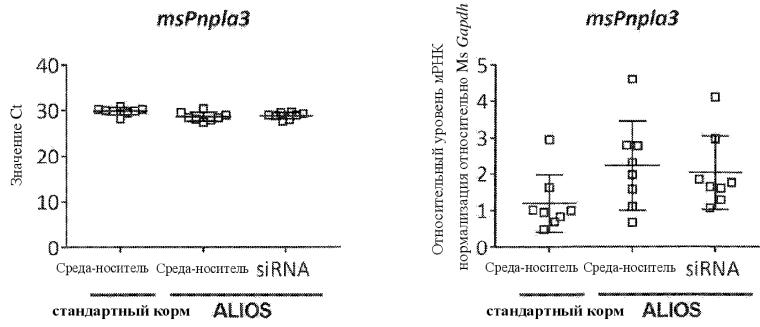
Фиг. 2G



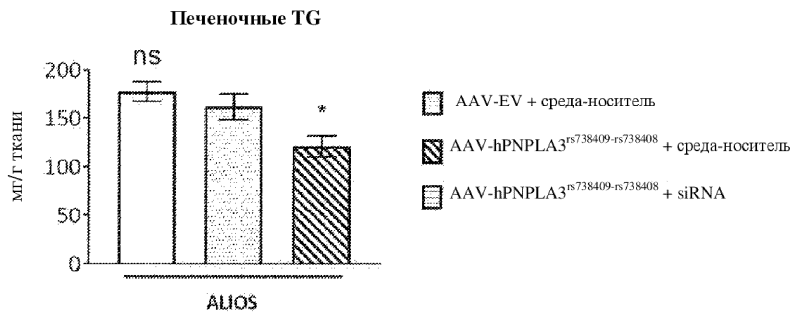
Фиг. 3A



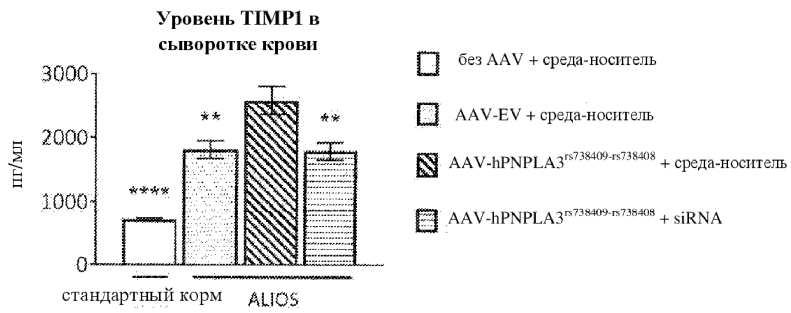
Фиг. 3B



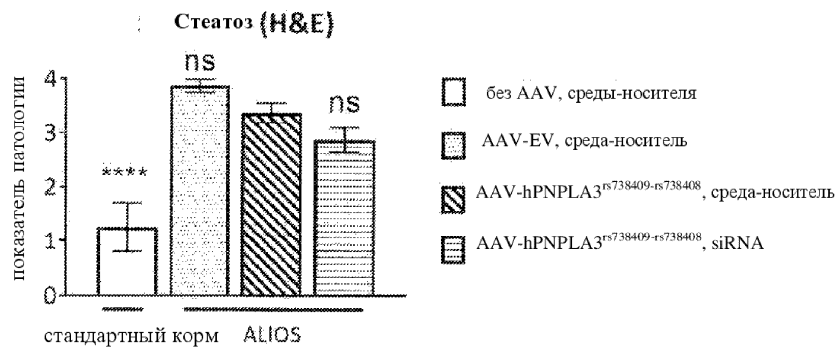
Фиг. 3С



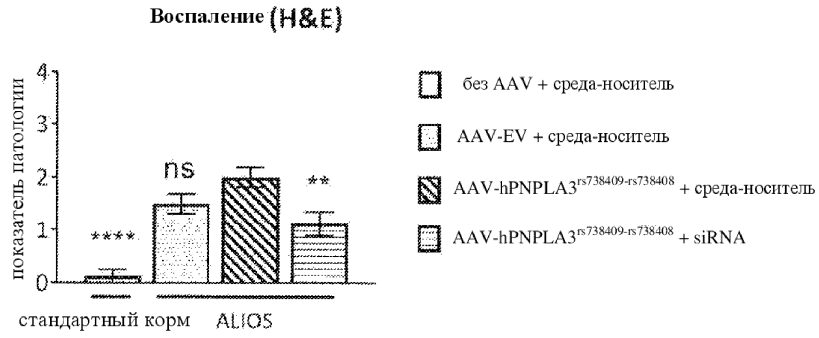
Фиг. 3D



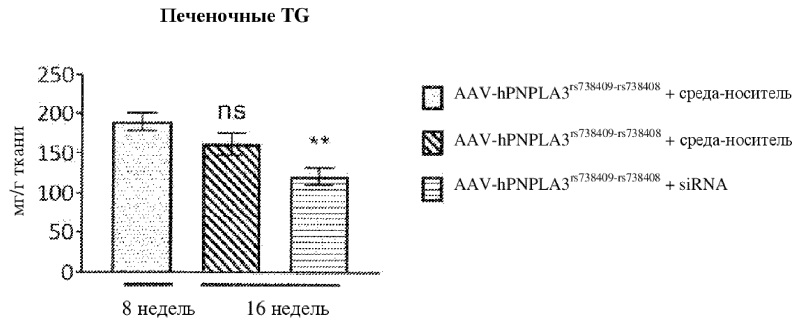
Фиг. 3E



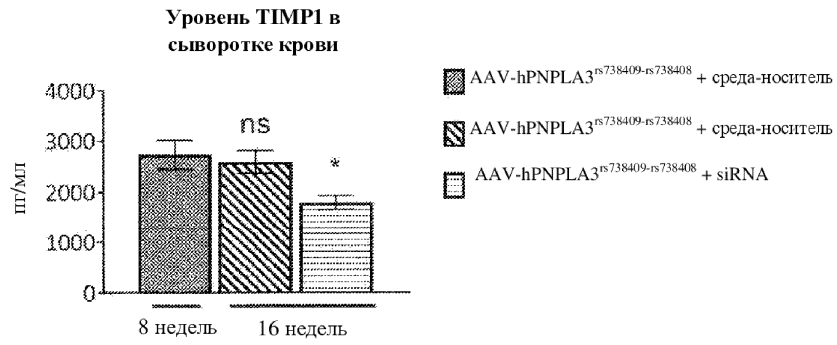
Фиг. 3F



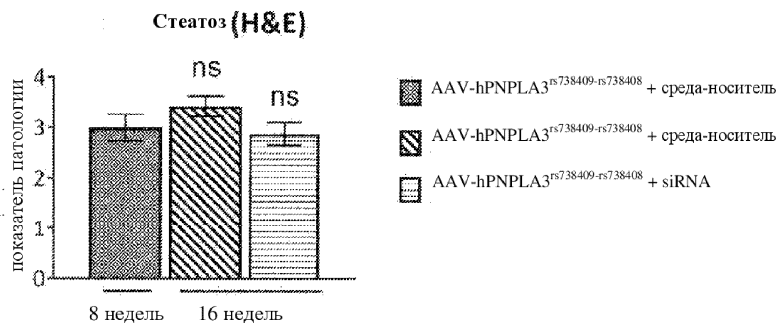
Фиг. 3G



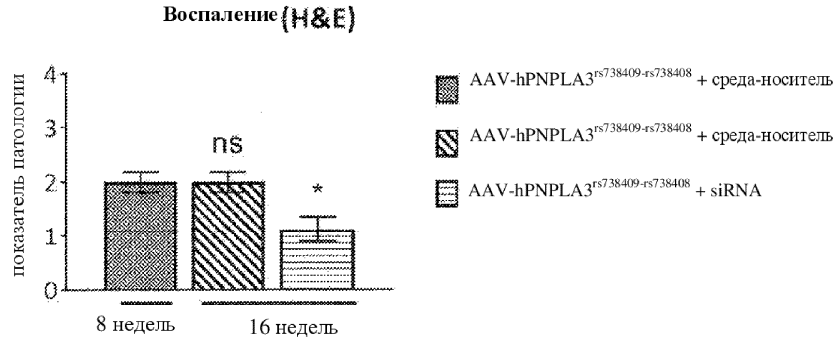
Фиг. 4A



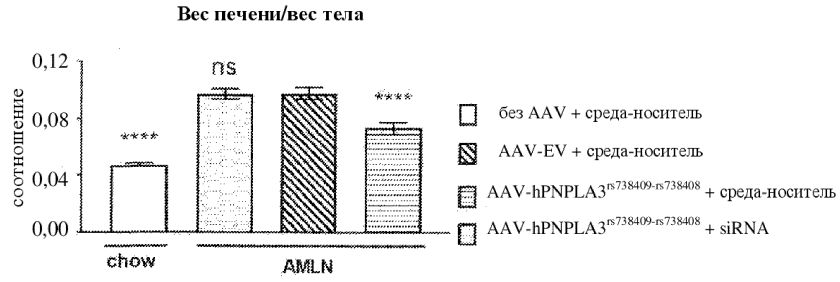
Фиг. 4B



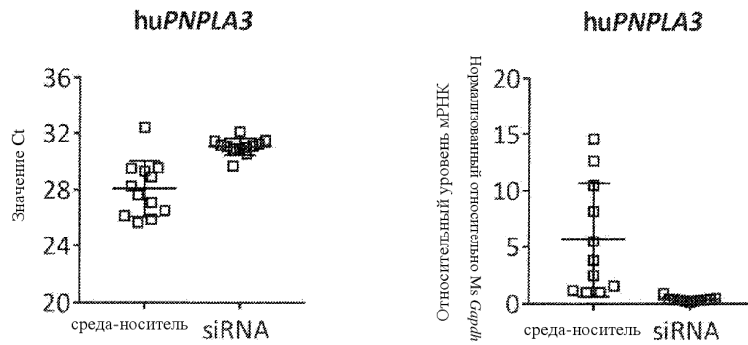
Фиг. 4C



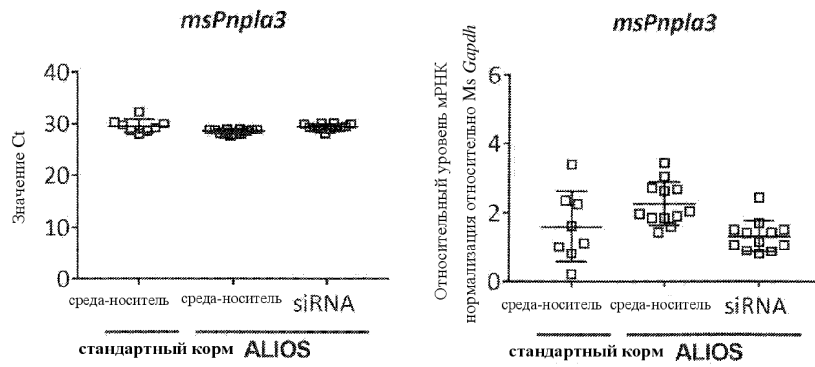
Фиг. 4D



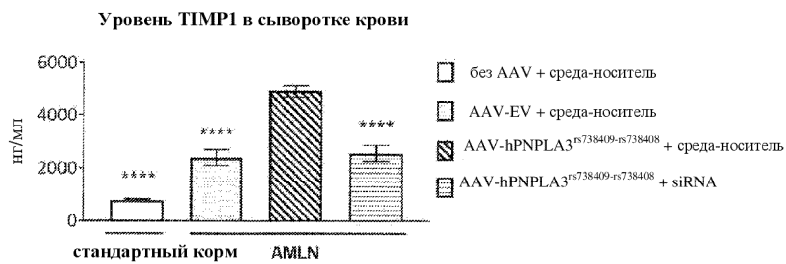
Фиг. 5A



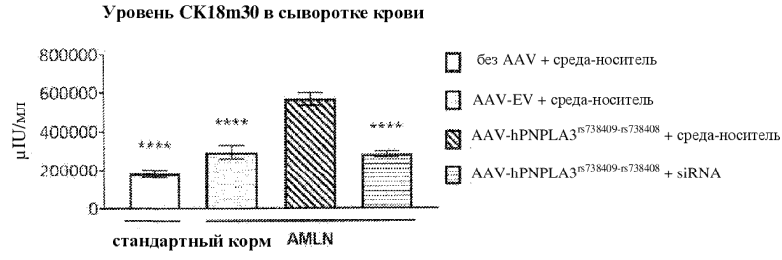
Фиг. 5B



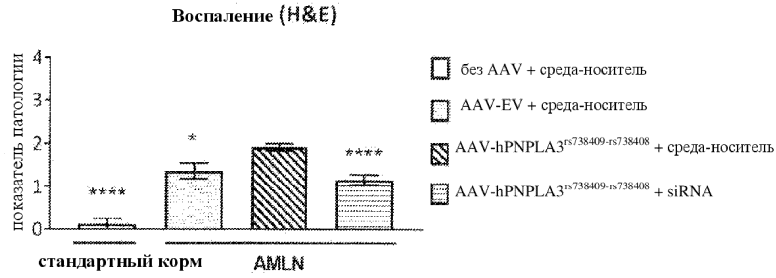
Фиг. 5C



Фиг. 5D

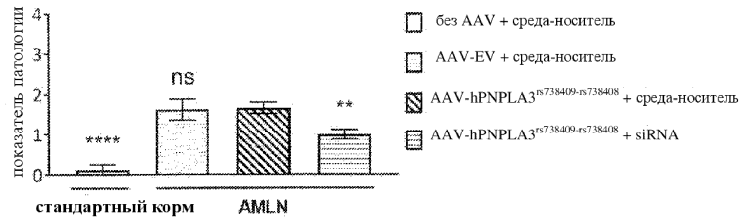


Фиг. 5E

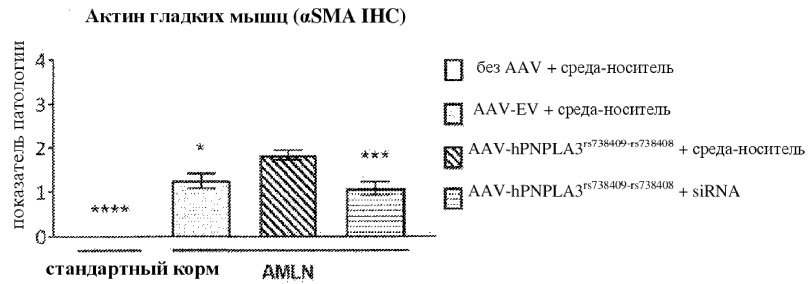


Фиг. 5F

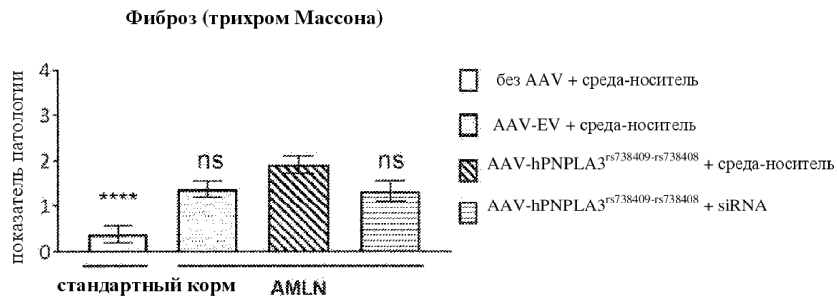
Гиперплазия овальных клеток/желчных протоков (H&E)



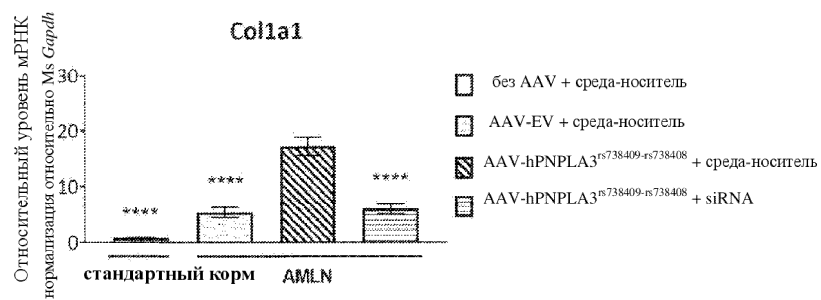
Фиг. 5G



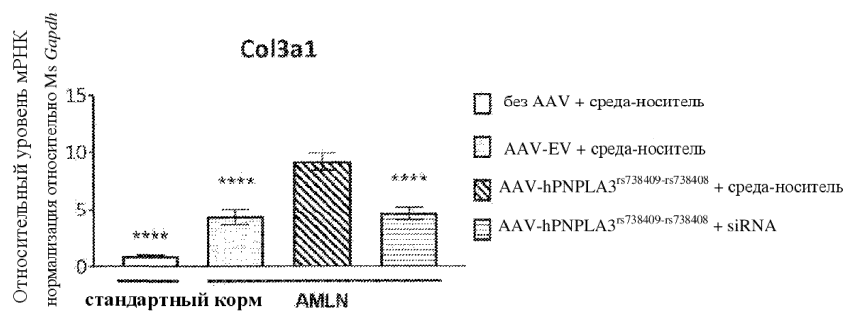
Фиг. 5H



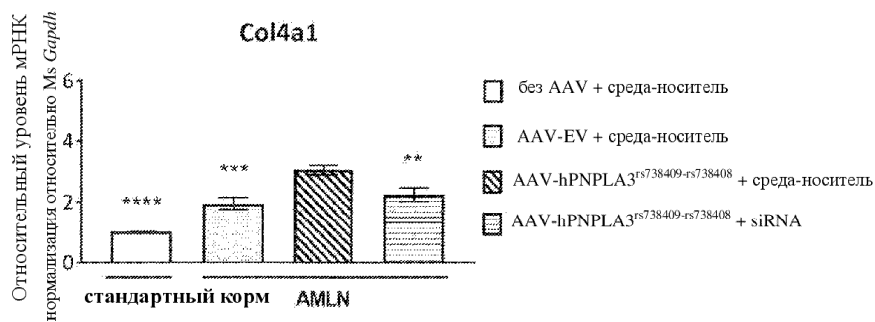
Фиг. 5I



Фиг. 5J



Фиг. 5K



Фиг. 5L

97 -

GATCTTTGGCCACTCCCTGTCTGCGCGCTGGTGGCTCAGTGAAGCCGCGCCGACCAAAAGTCCGCGGACGCGCCGGC
 TTTCCCGCGCGCGCCCTCAGTGAAGCGGACCCCGCCAGGAGAGGAGTGGCCAACTCCAGTCACTAGGGTTTCCTTCGG
 GAGTATACCTGAGTCATTAGGGACTTTCCAAATGGCTTTTCCCGAGTACATTAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAA
 AATGCCCATTTGGAGCCAGTACACATGAGTCAATAGGGACTTTCCCATGGGTTTTCGCCAGTACAAAGGTTCAATAGGG
 GGGGACTCAATGGCTTTTCCCATTTATTTCCCACTACATAAGGTCATTAAGGTCATTAAGGTTTTCGCCAGCA
 ATTTAAATTAAGAGCCCATGACTTTCCCACTTTGACGTCAGTCAAGGGGCTATTAAGTAAATGCAAGCTGACCTTTAAA
 CCGTACTTTCCCACTGACTTAAATGCGAAATACCGTTTCTCGAGCCAAATACAGTCAATGGGACTGAAAGGGGAG
 CCAAAAGCTTAACACCCGCGCGGTTTCCCGCTGAAATTCATATTTGGCAGCTATTCATTTGGGTGAGTGGTTTCTA
 CCGGCTTAAGAGGCGCGACCCAGGCTGGTACGCTCCGACTTTCCGCTCTGACCCAGCTAGAACCCAGAGCTCCCT
 TTTCCCATGCGCTCTCTGCGGAGGGGCGAGCTGGTCCCAAGCTTTCCACAGTGGAGAGCCCAAAACATAAAGAAAGGC
 CCGCGCCUATTTCTTTCCGCGGAGAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCAATAGGCTATGAAGAGTACCGCCCTGGT
 TCTTGGACAAATTTCTTTTACAGTTCAGATATCGAGCTGGCATCACTTACCTTGGTACTTTGAAATGCTCGGTTC
 GCTTCCAGAGCTATGAAACGATATGGCTGAAATACMAATCACAGACTTCTGCTATGCACTGAAAGCTTCTCTTCA
 TTCTTTATCCCGCTGCTGGGCGCTTATTTATCGGACTTTGACTTTCCGCGCCGAAACACATTTATATTAAGAAAGGTA
 ATTTCTTACAGATATGGGCAITTCGAGCGTACCGTGGTGTCTTTTCCAAAAGGGCTTGCAAAATTTTGAAGC
 TCAAAAAGAGCTCCCAATCAATCAAAATTAATATATCTGAAATTAAGAAAGGATACCGAGGATTTCACTGATG
 TACAGCTTCCGCACTCTACTACTGCTCCGCTTTTAAAGTAAATAGGATTTTGGTCCAGAGCTCTTCCGATAGGACAA
 GACACTTCACTGATCAIACACTTCTCTGGATCTACTGCTTGGCAAAAGGTTGCGCTCTGCTCTGGTGGCGCTCC
 GCGGAGATTTCTGGATGGCAGAGATCTATTTTGGCARTGAAATCTTCCGATACCTGCGATTTAAGTGTCTT
 CCATTCGATCAGGCTTTTGGATGTTTACTACTGCTGGATTTTGAATGCTGGATTTGGATCTGCTTAACTATAG
 AATTGAAGAGAGACTGCTTTCTGAGAGGCTTACAGTACAGATTTAAGAGTGGCTGCTGCTGCTCAAGCTTATCT
 CCTCTTCCGCAAAAGACTTCTSATGACAAATAGGATTTACTAATTTACAGAAATTTGCTTCTGGTGGCGCTCC
 CTCTTACGAGAGCTCCGCGCAAGCTTCCGAGAGCTTCCACTCTCCAGCTATCAGGCAAGGATTAAGGCTCTACTGA
 GACTACATCAGCTTCTCTGATTAACCCGAGGCGGATGAKAAACCCGCGCGCTCCGCTTAACTTCTCTCTTTTGG
 KAGCGAAGGTTTGGATCTCTATACCGGGAAGAGCTGGGCTTAAATCAAGAGGCGGACTGCTTGGAGAGGCTCT
 ATGATTAATCTCGGCTTAAACAAATCCGGAAGCGGCAAGCTTTGATTAAGAGGATGATGAGGCTTCTCTG
 AGACATACCTACTGGAGAGAGAGAGAGCTTCTTCTGCTCTTCCAGCGCTGAGGCTCTGATTAATTAAGAGGCT
 ATAGGCTGCTCCGCTGAAATGAAATCCGCTTCTGCTCCAGACCCCAACATCTTCCAGCGAGGCTGCTGAGAGTCT
 CCGAGAGTACCGCTTAACTTCCGCGCGCTTGTCTTCTTGGAGTACGGAACACATGACGCAAAAGAGAT
 CAGTGGATTAAGCTGCTGAGTAAACAAACCGGGAAGAGTGGCGGAGGAGCTTCTGCTTCTGAGAGAGTACCGA
 AAGCTTACGAGAACTGGAGCCAAAGAAATCAGAGAGATCTCTATTAAGGCGGAGAGAGGCGGGAAGATCCCG
 GGTAAATCAGAGCTAGCCAGATCCGCTGGGAGCGCTTATTTCTALAGAGGATCCGCTTCCGCGGCTCCGCG
 TCCGAGGCTTCTACCCGCTCCGCGAGCAGACTCTGAGGCTCTTCCAGATCTTGGCTGGAAGTGGATCCCTTGGT
 ATGCTCCGCTTCTGCTTCTTACAGTGGCTTATCCCTCTTCCGAGGAGTCCAGTCCCAAGGAGGCTTCTATG
 TGGCAATGCTAGTACAGCTTACTCTTCAATGATCCCAAAACAAAGCTTGGTACAGTGGCTTCCAGATAGGCGG
 CGATTTCCGCGCCGCAATCAAGCTCTGAAATCAAAATTTGTAAGAGATTCAGCTGCTATTTCTAACTATGCTT
 CTCTTACGCTATGCTGATACCTGCTTTAAATGCTTTTGTATCTCTATGCTTCCGCTTGGCTTCAATTTCTG
 TCCCTCTATAAAATCCCTGCTGCTCTTTATGAGGAGTCTGCTGCGCGCTTCTGAGGCAAGCTTGGCTTGGT
 TGTCTTCTGAGCAAGCTTCTGCTTGGGCTTCCAGCAGCTTCTGAGCTTCTTCCGCTTCTGAGCTTCTGAG
 CCGCTCTATTTCCGCGCGGAACTCATGCGCGCTGCTTGGCTTCTGAGGAGGCTTCTGAGGAGGCTTCTGAG
 GAGAAATGCTTGGCTTCTGCGGAGCTGAGCTTCTTCCATGCTGCTGCGCTTCTGAGGAGGCTTCTGAGG
 CCGAGCTTCTGCTGAGCTTCTTCCGCGCTCAATCCAGCGGAGCTTCTGCTTCCGCGGCTTGGTCCGCGGCT
 GCGCTTCTCCGCTTCTGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCG
 GCTTCTTCCGCTTCTGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCG
 HATGCTCAGAGAGTCTTTTCCCTTCTGCTTCCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCG
 CCATTTCCAGTCTATTTTCTGATGGCTTAAAGAGTCTTCCAGTCTGCTTCCGCTTCCGCGCTTCCGCGCTTCCGCG
 CCGAGCAGCTCTTAAAGAGATTTCTCTTAAATCCATTTGATATCTTCCGCTTCCGCTTCCGCGCTTCCGCGCT
 TATGCTGCTGAGTCTTAACTTCCAGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCG
 TGAAGCTTAAAGTCCAGCTTCCAGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCG
 CATCTATTTTGGGCGGCTGGGCTGGGCGAGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GATCTCTTCCGAGGTAAGCTCCAGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCG

Фиг. 6А

CTGGCGCTGGCTGCTCACTGAGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCTCGGGCAACTTTGGTCGGCCGGCTTCACT
 GAGCGAGCGAGCGCGGACAGAGGGATTTGGCCARAGATCTCGCGCTTGGCGTAAKATGGTCAIAGCTGTTCCTGGT
 TGAATTTGTTATCCGCTCACATTTCCCTACCAACATACAGCCCGGAAGCAIAAAGTCTAAAGCCCGGGCTGGCTAAAT
 AGTGAAGCTAACTCACATTAATTTGGTTGGGCTCACTGGCGGCTTTCCAGTCGGGAACCTGTCTGTTGCAAGCTGCAT
 AATGANTGGCCCAACGGCGCGGGAGAGCGGCTTTGGCTATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCACTCACTGACTGGCTG
 CCGCGGCTGGTTGGGCTGGGGACCGGATGACTCACTCAAGGGGCTTATACGGTTTTCACAGCAATTCAGGGG
 TAACCGCAGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAAGGAACCGTAAAAAAGCGCCGCTTCCCTGGCTTTT
 TCCATAGGCTCGGCTTCCCTGACGAGGATCCAAAANCCAGGCTCAAGTCAGAGTTGGCGAARCCGACAGGACTA
 TAAAGATACAGGCTTTCCCGCTTGGAGCTCTTTCCGCGGCTCTTCCGCTTCCGACCTTGGCGCTTACCGGATACCT
 GCGGCTTTTCTGCTTCCGGAAGCGGCTGGCTTTCTCTATAGTCAAGCTGTAGGTTCTCACTTCTAGCTGCT
 TTCCCTCCAGCTGGCTGTGTGACCAAGCCGCTTCCAGCCGCTTCCGCTTATCCGCTAATCTGCTTCT
 GAGTCCAGCCGCTAAGACAGGACTTACGCTCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAAGCAAGCGGCTATGT
 AGCGGCTGGTACAGATTTCTTGAAGTGTGGGCTTACTACGGCTTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGGCTC
 TCCCGAAGCCAGTTTCCCTTCCGAAAAAGATTTGGTACTTTTGGTCCGGCAACAAAGCCAGCGCTTACTGGCTGCT
 TTTTGTGTTTUCAGGAGCAGATTAAGCGGCAAAAAGGATTTCAAGAAGATCTCTTGTATCTTTTACTGGCTGCT
 TCACTCTCAGTGGAAAGCAACTCACTTAAAGGATTTGGGCTGAAATTAAGAAAGGATCTTCACTTACTGATCC
 TTTTAAATTAAGAAATGAAGTTTAAATCACTTAAAGTATATATGAGTAACTTGGCTTCACTTACAGATTTACTT
 ATCAGTGGGCACTATCTCAGCGATCTTCTATTTCTGCTCATCTCACTTCCCTGACCTCCCGCTGGTGAATAGC
 TACGTTACCGGAGGCTTACCATCTGGCTCCAGTCTGCAAGATACCGCGAGACCCAGCTTCAAGGCTTCCAGAT
 TATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGCGGAGCGCAAGTGGTCTTCAACTTATCCGCTTCACTTCACTCT
 ATTAATTTTCCCGGAGGCTAGGTAAGTAGTTCCGCACTTAAAGTTTGGGCAAGCTTGTTCGCTTCTTACTAGG
 CATCTGGCTTACCGCTGGCTTGGTATGGCTTAAATCAGCTCCGCTTCCCAAGCATCAAGGCGAGTTACTATGAT
 CCGCTCATGTTCTGCAAAAAGGGCTTAGCTCTTCCGCTCTCCGATCTTGTGAGAAATTAAGTTTCCCGGAGTGT
 TCACTCAAGGTTATGGCAGGCTTCAATAATCTCTTACTGTCATGCTCATCCGTAAGGCTCTTTCTCTCACTGGTGA
 GTACTCAACCAACTCATTTGAGGATAGTGTATGGCGGAGCCGAGTTGCTTCTTCCCGGCTTCAATACCGGATAAATA
 CCGCGCCACATAGCGCAACTTTAAAGTGGTCAACATGGAAGACTTCTTCCGCGGCAAAAGCTCTCAAGGATCTTA
 CCGCTGTTGAGATCCGCTTGGATTAAGCCAGCTGCTCAAGCAACTGATCTTGGCTTCTTACTTTCAAGAGCT
 TTTGGGTTGAGCAAAAGCAGGAGGCGAAATTTCCGCAAAAGGGAATTAAGGGGAGCAGGGAATTTCAACTCA
 TACTCTTCTTTTCAAFATTAATGAAGCATTTACAGGCTTATGCTCTCATGAGCGGATACATATTGAAATGATTT
 TGAATAATTAACAAATAGGGGTTCCCGGCAATTTCCCGAAAAACTGCACTTAATTTGAAGGCTTAAATTTT
 TAAATTTCCGCTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAAGCAATAGCGGAAATCTGGAAATTCGCTTATAA
 ATCAAAAGATAGACCCAGATAGGCTTGGGTTGTTGCTTCCAGTTTGGAAACAGGATTTCACTATTAAGACCTGGGCT
 CCAAGCTCAAAAGGCGAAGACCTCTATCAGGGGATTTCCGCACTTACTTGAAGCAATCAAGCTTAACTCAAGTTT
 GGGTCAAGGCTGCTTAAAGCTTAAATTTGAAAGCTTAAAGGAGCAGCCCGGATTTAGGCTTGAAGCGGAAAGCGG
 CAAGCTTGGCTGAGAAAGGAGGAAAGGCGAAAGGAGCGGCGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCT
 GCGTAAAGCAAGCAGCCCGGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGGAGCAGCCCGGATTTAGGCTTGAAGCGGAAAGCGG
 TGGAAAGGCGGATCTGCTCCGCGCTCTTGGCTATTAAGGCAAGTGGGCAAGGCGGATTTGCTTCAAGCGGATTAAG
 TTGGCTAAGCGGAGGCTTTTCCGCTCAGGAGCTTGAAGCAAGGCGGAGTGGGCGGA-3'

Фиг. 6В

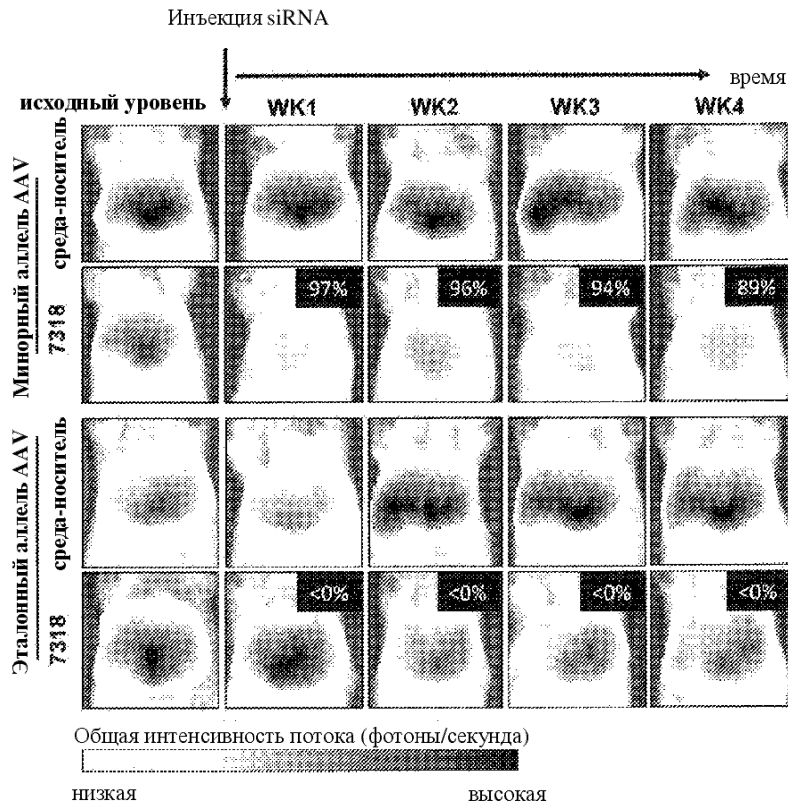
5' -
GATCTTTGGCCACCTCCCTCTCTTTCGGGGTTCCTCCTCAGTTSAGGCGCGGCGCCCAAGGTTGGCCGAGCCGGGCG
TTTTCCCGGCGCCCTCACTGAGGAGAGCGGAGCGCGAGAGAGGAGTCCGCAACTCCATDCTAGCGCTTCCCTTCGC
GAGTATCTGAGTCATTAAGGACCTTCCAAATGGGTTTTGCGCGGTACATAGGTCATATAGGGGGGGAATCCACAGGAA
AGTCCCATTTGAGGCTAAGTACAGCTGAGTTAATAGGGGACCTTCCATGGGTTTTGGCCCATACAAAGCGTCCATAGC
GGTGAATCAATGGTTTTTCCCATATTGGCAGGTACATAGGTCATAGGGTACATAGGGTTCATAGGGTTTTTCCAGTCA
ATTAAATTAAGAGCCCATGAGTCTCCCAACCAATGAGCGTCAATGGGATATGAAACTAATGCAAGCTGACCTTAAG
CGGTACTTTCCCATAGCTCAATTAATGGGAAAGTACCGGTTCTGGGCCAAACACACCTCAATGGGAAGTGAAGGGCAG
CCAAAGCTAAGACCCGCCCCCGTTTTCCCTGGAAATCCCAATTTGGCACCGCATCTATAGGCTGAGCGCCGCTCTA
CGTGGTATAGAGAGCGCCGACCACTCGTCCGTACCCCTGGCACTCTTCGGTCTGGCCGACCGTGAAGACCCAGAGCTCTCT
TCCTCCATCTCTGTCAGCGAGGGCCAGCTGGTCGACAGCTTTCCACCTGGAAAGACCCCAAAACATAAAGACGGC
CCGGGCGGATTCCTATCCGGTGGAAAGATGGAGCGCTGGAGACCACTGCTAAAGGCTATGAAAGGATAACCCCTGCT
TCCAGCAACTATGCTTTTACAGATGGACATATCGAGGTGGACATCACTTACCTGAGTACTTCCAAAATCTCTCTTC
GTTGGGAGAGCTATGAAGCGATATCGCTGAAATCCAAATCACAAATCGTCTCTTGGCAGTGAAGACTCTCTCAAA
TTCCTTATGCGCTTCTTGGCGCGCTTATTATCGGAGTTCAGTTGGCCGCGCAACGCATTTTAAATTAAGCTCA
ATTGCTCCACAGATATGGGCATTTCCAGCGCTTACCGTCTTGTCTGCTTTCCAAAAGGGGTTCCAAAATTTTTAAGC
TCCAAAAGAGCTCCCAATCCATAAAGATTAATATATGATGATTTCAAAGGATTAACAGGATTTCCAGTCTCTCT
TACAGCTGGCGCACATCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATAGGATTTTGGCCAGAGTCTCTCGAAAGCGACT
GACAAATTCGACCTGATDATTGACTCCCTCTGAACTACTTGGTCTCCCTAAAGGTTGCTCTTCCCTCATAAGCCTCT
CCGTGAGATTCGCGCAAGCCGACGATCTATTTTGGCAATCAAATCACTCCCGATCTGGCATTTAAGTGTCTCT
CAATTCGATCCCGCTCTTGGAAATGTTTACTACACTCCGAAATTTAATAATGGGATTTCCAGTCTCTCTAAATGTATAG
AATTCGAAAGAGAGCTTTCTTGGAGCGCTTACCGATTAACAGATTCAGAGTTCAAGAGTCCGCGCTGCTGGCGAGAGCTCT
CTTCTCTGGCCAAAGCAGCTCTGATTGCAAAAATCCCATTTATCTAATTTCCAGCAATTCGCTTCTGGTGGCGCTCC
CTCTTAAGGAGTTCGGGCAAGCGGTTCGCAAGCGTTCCATCTTCCAGATAGCAGGCGAGGATTTGGCTCTACTGA
GACAGACTCAGCTATTCCTATTACACCCAGGGGGATTAAGCCGCGCCGCTCCGTAAGTTTTGCTCCTATTTTTC
AAGCGAAGCTTGGCGATCCGGAATCCGGSAAGACCTGGCGTTAATCAAAGAGCCAGCTGCGGTGAGAGGCTCT
ATGATTTGCTCCGCTATATGTAACCAATTCXGAAATGACCAAGCGCTTCAATCACAGGATCGATGCTTACATTCTGG
AGCATAGCTTACTCGGAGAAAGAGACCTCTCTTCACTGCTGAGCCCTGAAAGTCTCTGATTAAGTACAAGCGCT
ATCAGGTTGCTCCCGCTGAAATGGAAAGCATTTGCTCCGACAGCCCAACATTTCCAGCGAGGTCTCCCGCTCT
CCGACAGTACCGCGCTTCAACTTCCCGCCCGCTTCTTCTTCTTGGAGCACCAAGAGAGATGACCGAAAGAGAT
CGTGGATTAAGCTCCGCAATCAAGTAAACACAGCGGCAAGAGTTCGGCGAGAGGATTCGTTCTGCAAGAGTACTCGA
AAGCTCTTACCGAAAGATTCGAGTCAAGAAATACAGAGAGTCTTCATAGGCGCAAGAGAGGGCCGAAAGATTCGCG
GTGTAATCAAGAGTACCGCAGATCTTGGCAGCTCTTATTGTTATAGAGCGTTCAGTTCGCGCGCTCCCG
TTCCCGCTTCTACACCTCCGGAGCAGACTCTCCAGCTCTCTCAGATCTTGGCAGAGGTGGATGCTTTGGT
ATCTCCCGCTTCTATDCCCTCTACAGTGGCTTATCCCTCTTGGAGAGTACTGACAGCTTACCTTCTATGSA
TCCAAAGTTCAGTCAAGAGTACCTCTCTTCTGAGCAAGCAAGCACTTGGAGATGCTTCCAGATAGCGGCA
CAATCTCCCGGCTCCCAATCAAGCTCTGAAATCAAAAATTTCTGAAAGATTCAGTGGATTTCTAAGTATGCTGCT
CTTTCGCTATGTCGATACCTCTTAAAGGCTTTTGTCTCTCTTCTTCTTCTGATGCTTTCTATTTCTCC
TCTTGTATAAATCCAGGTTCTCTCTTAAGAGGATTTGGCGCTTCTCAAGAGCTTCCGCTCTCTCCGAC
TGTGTTCCTGACCAAGCCACTCTTCCGCTTTCGCAAGCTTTCAGCTCTCTTCCGAGCTTTCGCTTTCC
CCCTCTTATTCAGCCCGACTCCTCCCTTCCCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCT
GCAATTCCTGGGTTTCGCGGAAAGCTTACTTCTTCCATGCTTCCCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCT
CCGAGCTCTTCTCTACTCTCTTCCGCTTCAATCCAGCGACTTCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCT
GCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCT
TCTATCTCAGAGATCTTCTCTATGTTCTCTCTAGGACTTCTATAGTTCCTGCTTCTATGCTTTAAT
CAATTTTCAATTTTCTGATGTTGTTAGAAAGTGGTCTAGTTTCAATCTTTTCAAGTCTTCAAGCAGATTT
CCCAAGCACTCTTCAAGAGATTTCTTAAATCAATTCATATCTTCCCTCTTCTCAAGATTAAGGTTCCCA
TATGTTCCCTGAAATTAATCCCTGACTGCTCTTCTAGTTCCAGGCACTCTGTTCTTCCCTCTCCCTTCCCT
TGAACCCAGAGGTTCCCACTCCCTCTCTCTTCTTAAATAAATGAGGAAATTTGCATCTCATTTCTCTAGTACCT
CATCTATTTCTGGCGCTGCGCTTCCCGCAGGACAGTAAAGGGAGATTCGGGAAGCAATAGCAGGCAATGATATCAG
CATCTCTGGAAGTAAAGCTTCACTGGGATCTCGAGAGAAACCCCTATGATGAGTTCGGCACTCCCTCT

Фиг. 7А

```

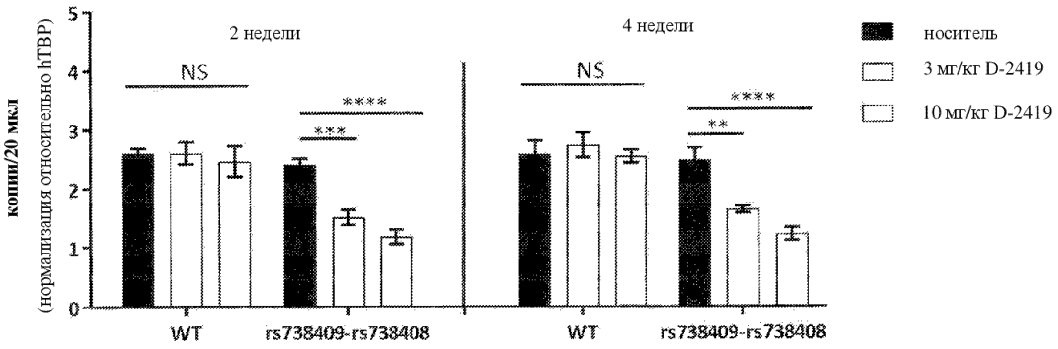
CTGGGESCIGCCFPGGTCACTGAECCCGCCCGGGCAAAGCCCGCCGCTCGGCTGACCTTTGGTDCGCCGKCTCAGF
GGGCGAAGCGAGCCGCGCAGAGAGGGGATGGCCAAAGATCTCGCCCTTGGCGTAAFCATGGTCAIAGCTGTETCCCTGTG
TGAATTTCTTAACTCCCTCRCAATTCACACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGGCTGGGGTGCCTAATC
AGTGAAGCTAACTCACATTAATTTGCTGGCCCTCACTGCTCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCCAGCTGCALLF
AATGAATCCGCAACCGCCCGGGCAGAGCGGTTTGGCTATTGGCCCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTGCTG
CGCTGGTCCGTTCGGCTCCGGCGAGGGTATCAGCTCACTCAAGGKXGTAATACCGTTRATCCACRGAATCAGGGGA
TAAAGGAAAGAACATGTAGCAAAAGCCGAGCAAAAGGCUAGGAACCTTAAAAAAGCCGCTTTCGCGCCCTTTT
TGGTAAAGGCTCCGCGCCCTGACAGGACATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGGGAACCCGACAGGACTA
TAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCGGGAAGCTCCCTGCTCCGCTGCTCTGTTCCGACCCCTGCGGCTTACCGGATACCT
GTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGGCTTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCGTGTAGGTATCTCASTTCCGCTGTAGGCTG
TTGGCTTCAAGCTGGCTGTGTGCAACAAACCCGCTTCAGCCCGACCCCTGCGCTTATCCGCTAACTATCCCTTT
GAGTCAACCCCGGTAAAGCACGACTTATCCGACCTGGCCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGTACGCTATGT
AGGCGTCTCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACCTACGCTACACLAAGAGGAGAGTATTTGGTCTCTCCGCTC
TGGTGAAGGCTATACCTTCGGAAAAGAGTGGTAAAGCTCTGATCCGCAACCAACCCACCGCTGGTACGCGTGGT
TEETTTGTTTGAAGAGCAGCTATACCCGCGAAGAAAGGATCTCAAGAGAGATCTTTGATTTTCTCAACGGGCTC
TGGCGCTCAGTGGAAAGAAACTCAGCTTAAAGGATTTGGCTGATCAGATTAACAAGAGGATCTTCACTAGATCC
TTTTAAATTAAGAACTGAAGCTTTAAATCAATCTAAGATATAATGAGTAAACTTGGCTCCAGAGTACCAATGCTTA
AXCAGTGAAGCACTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGGCTCAAGCAATGCTGGCTGACTGCGCTGCTGATATAAC
TACATACCGGAGGCTTACCATCTGGCCGAGTGTCTGATGATACCCGAGAGCCGCTCAGCGGCTCCAGATTT
TACAGCAATAAAGCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCCGAGAAATGCTCTGCACTTATCCGCTTCTGCTGAGTCT
ATTAATTTGCTCCGGAAGCTAGAGTAAAGTCTCCGAGTAAATAGTTTCCGCAAGCTTGTTCGATTCCTACAGG
CACTGGTGTCTCAGCTCCCTTCTGATGGCTCTCTCAGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCTTCAATGAT
CCCCATGTTTGGCAAAAGCGGTTAGCTCTTCCGCTCCGATCCCTGCTCAAACTAAGTTGGCCGAGTGTTA
TCACCTGAGGCTTATGGCAGCACTGGATAATCTCTTACTGTCAGCCGATCCGTAAGATGCTTTCTCTGACTGGTGA
GACTGCAAGCACTCATTTCTGAGATAGTGTATCGCGGAGCCAGTTGCTCTTCCGCGGCTCAATACGGTAAATA
CCGCGCTACATACAGCACTTTAAAGGCTGTCTCATCTGGAAAGGCTCTCTCCGCTCCAAAGCTCTCAAGGATCTTA
CCGCTTTCGAGATCCAGTTCGATGTAAAGCACTCCGCAACCACTGATCTTCAAGCTCTTTACTTTCAGCAGGCT
TTCTGGGTGAGCAAAACAGCCAGCCCAAAATCCGCAAAAGGCAATAGGGGCGCAGGAAATGTTGAATACTCA
TACTGTTGCTTTTCAATATTTAAGGCTTTAAGCGGCTATTGCTCTCATCAAGGATAGATTTTGAAGCTATT
TAGAAAATAAAGCAATAGGCTTCCGCGCAGATTTCCGCAAAAGGCTCCACCAAAATTTGAAGCTTAAATTTG
TTAAATTTCCGCTTAAATTTTGTAAATCAGCTCTATTTTTAAAGCTAGCCGCAATGCGCAAAAGCTCTTATA
ATCAAAAGAAAGAGCCAGATAGGCTTGAATGTTGTTCCAGTTTGGAAAGAGCTCCACTATTAAAGCAAGCTGGAGT
CCAGCCGCAAGAGCCGAAAGCCGCTATGAGGCGATGGCCAGCTGCTGAAAGCTTACGCTAATCAAGTTTTCG
GGCTCCAGGTTCCGCTTAAAGCACTAAATCCGAAACCTAAAGGAGCCCCGATTTAGAGCTTACAGCGGAAAGCCGGC
GAAGCTCCGCAAGAGGAAAGGAAAGAGGCAAGGAGCCGCGGCTAGCGGCTTCCAGCTTACAGCTTACAGCTTCC
GCTTAAAGCAGCAGCCGCGGCTTAAAGGCGCTACAGGCGCTCCGCTTCCGCTTCCGCTTACAGCTTCCGCTTCC
TGGCAAGGCGCTAGCTTCCGCTTCCGCTTACAGCTTCCGCTTACAGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCC
TTGGGTAAAGCCGCTTTCGCAAGTACAGCTTGTAAAGGAGCCGCTAGTGAAGCGCA-3'
    
```

Фиг. 7B



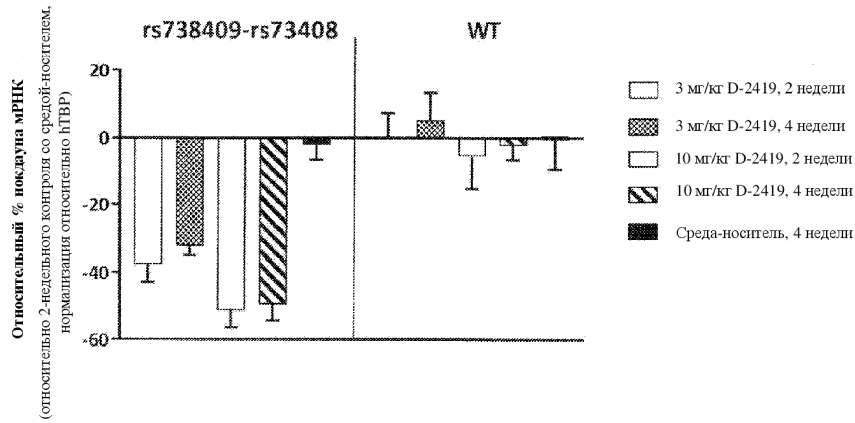
Фиг. 8

Экспрессия мРНК *PNPLA3*^{WT} по сравнению с экспрессией мРНК *PNPLA3*^{rs738409-rs738408}



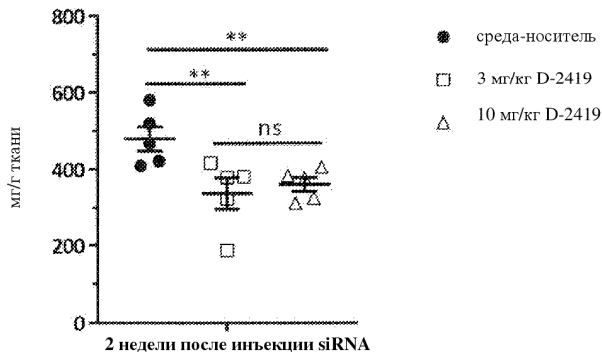
Фиг. 9А

Покдаун мРНК, селективной в отношении аллеля *PNPLA3*^{rs738409-rs738408}

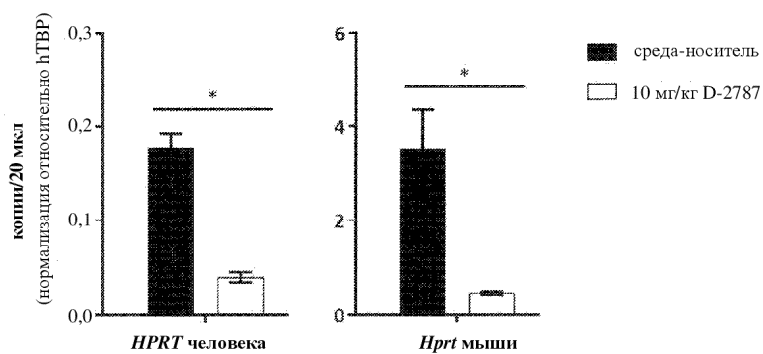


Фиг. 9В

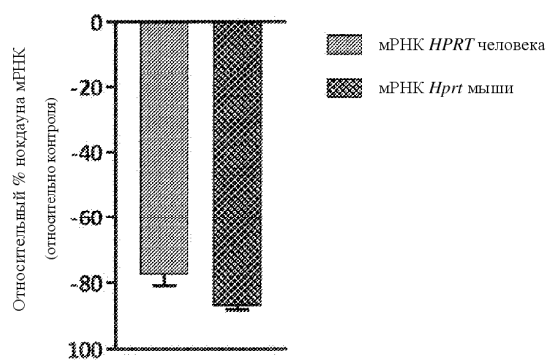
Содержание триглицеридов в печени



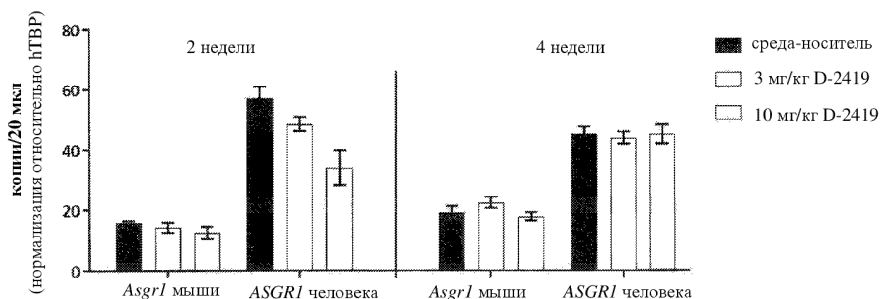
Фиг. 9С

Экспрессия мРНК *HPRT*

Фиг. 9D

Нокдаун мРНК *HPRT*

Фиг. 9E

Экспрессия мРНК *ASGR1*

Фиг. 9F

