

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391438 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.29

(22) Дата подачи заявки  
2014.03.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*C07H 15/04* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/712* (2006.01)  
*A61K 31/7125* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 47/14* (2017.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

---

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

---

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

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

(33) US

(62) 201591707; 2014.03.13

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

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

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

---

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

A1

202391438

202391438

A1

**КОМПОЗИЦИИ И РНК КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА C5 И СПОСОБЫ ИХ  
ПРИМЕНЕНИЯ**

**РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/782531, поданной 14 марта 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/837399, поданной 20 июня 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/904579, поданной 15 ноября 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/912777, поданной 6 декабря 2013 г. и предварительной заявке на патент США № 61/942367, поданной 20 февраля 2014 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых предварительных заявок на патенты, таким образом, включено в данный документ посредством ссылки.

**ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и, таким образом, включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия файла с кодировкой ASCII, созданная 10 марта 2014 г., имеет название 121301-00520\_SL.txt, и ее размер составляет 734486 байт.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Комплемент был впервые обнаружен в 1890-х годах, когда было обнаружено способствование или "комплектное" уничтожение бактерий термостабильными антителами, присутствующими в нормальной сыворотке (Walport, M.J. (2001) *N Engl J Med.* 344:1058). Система комплемента состоит из более чем 30 белков, которые либо присутствуют в виде растворимых белков в крови, или присутствуют в виде белков, ассоциированных с мембраной. Активация комплемента приводит к последовательному каскаду ферментативных реакций, известных как пути активации комплемента, в результате чего формируются мощные анафилотоксины C3a и C5a, которые вызывают множество физиологических реакций, варьирующих от хемоаттракции до апоптоза. Первоначально считалось, что комплемент играет важную роль во врожденном иммунитете, в результате чего устанавливается надежная и быстрая

реакция против вторжения патогенных микроорганизмов. Тем не менее, в последнее время становится все более очевидным, что комплемент также играет важную роль в адаптивном иммунитете с участием Т- и В-клеток, которые помогают в ликвидации патогенных микроорганизмов (Dunkelberger JR и Song WC. (2010) *Cell Res.* 20:34; Molina H, et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3357), в поддержании иммунологической памяти, предотвращающей повторное вторжение патогенов, и участвует в многочисленных патологических состояниях человека (Qu, H, et al. (2009) *Mol Immunol.* 47:185; Wagner, E. и Frank MM. (2010) *Nat Rev Drug Discov.* 9:43).

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

На сегодняшний день доступно только одно терапевтическое средство, нацеленное на C5-C5a компоненты, для лечения заболеваний, связанных с компонентом комплемента C5, которое представляет собой антитело к C5, экулизумаб (Soliris®). Хотя

экулизумаб показал эффективность при лечении пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) и атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), и в настоящее время оценивается в клинических испытаниях для лечения дополнительных заболеваний, связанных с компонентом комплемента C5, терапия экулизумабом требует еженедельных инфузий высоких доз, с дальнейшими инфузиями раз в две недели, с ежегодной стоимостью приблизительно 400000 \$. Соответственно, существует потребность в данной области в альтернативной терапии и комбинированной терапии для субъектов, имеющих заболевание, связанное с компонентом комплемента C5.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

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

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

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

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечному средству RNAi для ингибирования экспрессии

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

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

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

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокси-тимин (dT) нуклеотида, 2'-O-метил

модифицированного нуклеотида, 2'-фтор модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, азбазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида морфолино, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего основу не природного происхождения, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, и концевого нуклеотида, связанного с производным холестерина или бис-дециламидной группой додекановой кислоты.

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

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

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

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

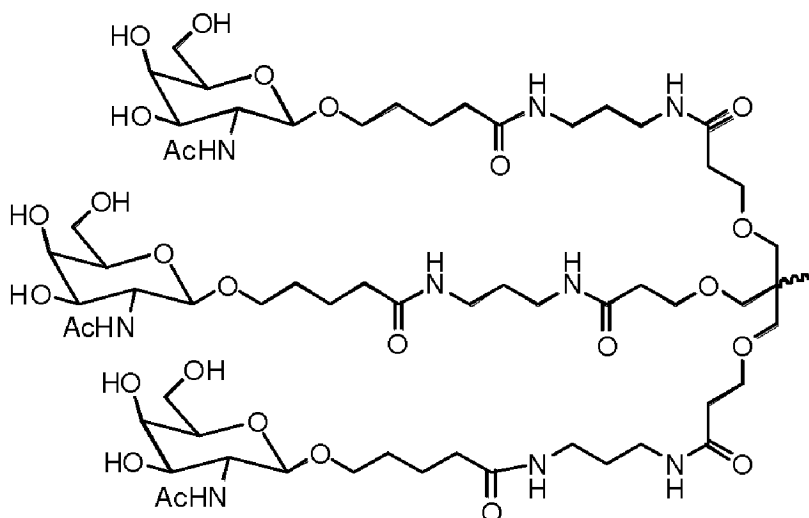
В одном варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 2 нуклеотидов.

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

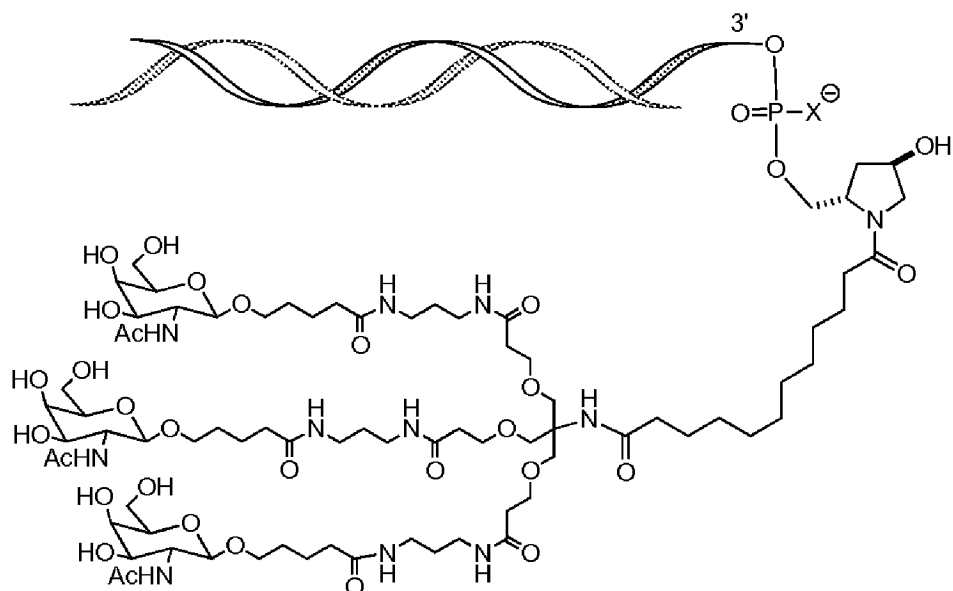
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи средства, представляющего собой dsRNA.

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

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



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



и где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

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

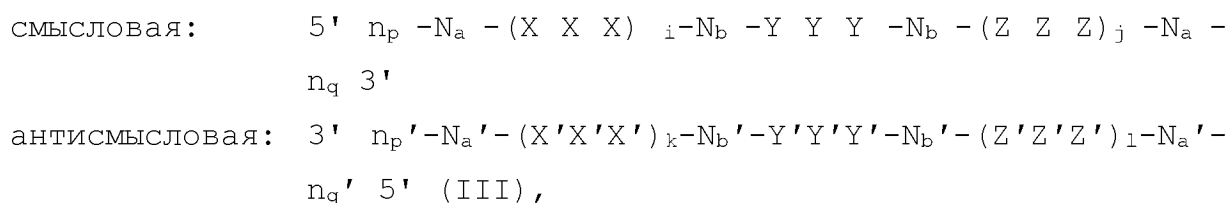
В одном варианте осуществления средство, представляющее собой dsRNA, выбрано из группы, состоящей из AD-58123, AD-58111, AD-58121, AD-58116, AD-58133, AD-58099, AD-58088, AD-58642, AD-58644, AD-58641, AD-58647, AD-58645, AD-58643, AD-58646, AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651.



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

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

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



где:

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

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

каждый из  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая

последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

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

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

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

СМЫСЛОВАЯ:  $5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3'$

АНТИСМЫСЛОВАЯ:  $3' n_{p'} -N_{a'} - Y'Y'Y' -N_{b'} -Z'Z'Z' - N_{a'} - n_{q'} 5'$  (IIIb),

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

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

СМЫСЛОВАЯ:  $5' n_p -N_a -X X X -N_b -Y Y Y -N_a - n_q 3'$

АНТИСМЫСЛОВАЯ:  $3' n_{p'} -N_{a'} - X'X'X' -N_{b'} - Y'Y'Y' - N_{a'} - n_{q'} 5'$

(IIIc),

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

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

СМЫСЛОВАЯ:  $5' n_p -N_a -X X X - N_b -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3'$

АНТИСМЫСЛОВАЯ:  $3' n_{p'} -N_{a'} - X'X'X' - N_{b'} -Y'Y'Y' -N_{b'} -Z'Z'Z' - N_{a'} - n_{q'} 5'$

(IIId),

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

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

В одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-23 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-25 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 23-27 пары нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 19-21 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 21-23 пару нуклеотидов.

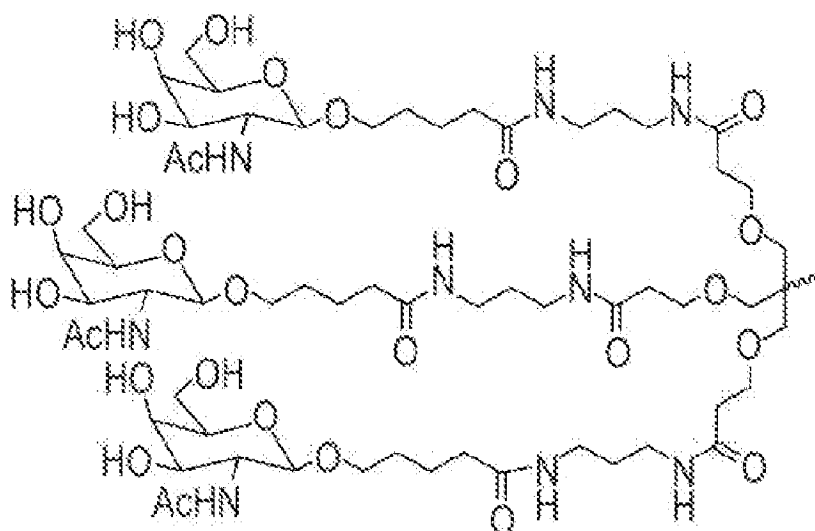
В одном варианте осуществления каждая цепь содержит 15-30 нуклеотидов.

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

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

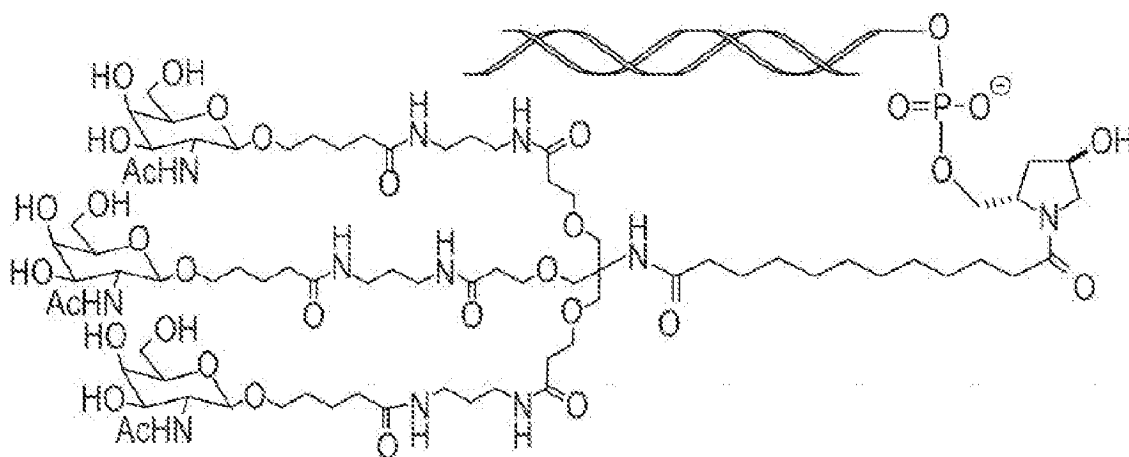
В одном варианте осуществления лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



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

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



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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь.

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

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

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

В одном варианте осуществления  $r' > 0$ .

В одном варианте осуществления  $r' = 2$ .

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

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

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



олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

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

смысловая: 5'  $n_p$  - $N_a$  - (X X X)<sub>i</sub> - $N_b$  - Y Y Y - $N_b$  - (Z Z Z)<sub>j</sub> - $N_a$  -  $n_q$   
3'

антисмысловая: 3'  $n_p'$  - $N_a'$  - (X'X'X')<sub>k</sub> - $N_b'$  - Y'Y'Y' - $N_b'$  - (Z'Z'Z')<sub>l</sub> - $N_a'$  -  
 $n_q'$  5' (III),

где

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

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

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

$n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним

нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

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

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

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

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

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

где

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



каждый из  $n_p$ ,  $n_q$ , и  $n_{q'}$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

$n_{p'} > 0$ , и по меньшей мере один  $n_{p'}$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

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

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

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

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

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

(III):

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

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

где

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

где

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления средство RNAi вводят в буферном растворе.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

окажет благоприятное воздействие.

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

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

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного средства RNAi, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов,

отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими лигандами на 3'-конце.

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

В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение.

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

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное



воздействие, которые включают введение субъекту профилактически эффективного количества двухцепочечного средства RNAi, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь конъюгирована с одним лигандом на 3'-конце.

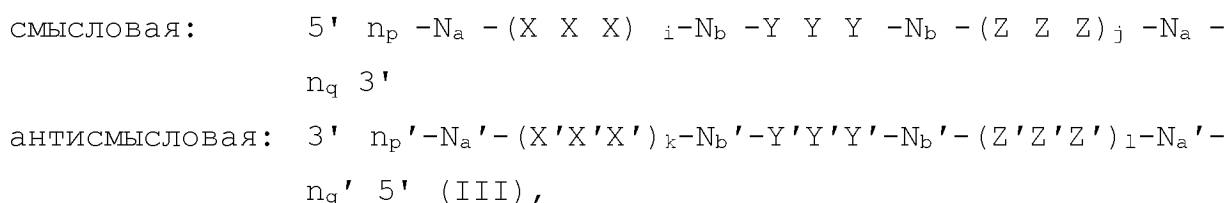
В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение.

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

конце.

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



где

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

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

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

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

каждый из  $p$ ,  $p'$ ,  $q$  и  $q'$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

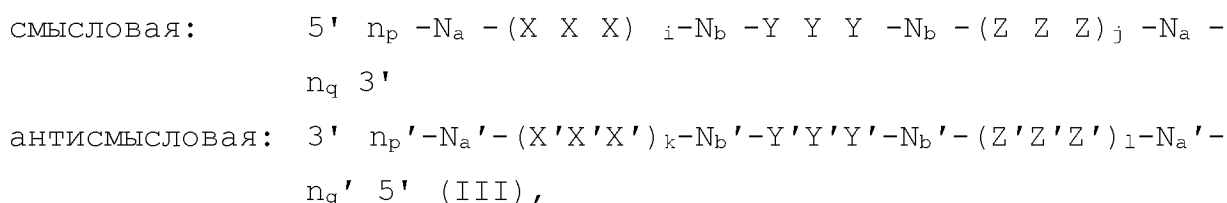
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации Y, а модификации

$N_b'$  отличаются от модификации  $Y'$ ; и

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

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



где

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

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

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

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

каждый из  $n_p$ ,  $n_p'$ ,  $n_q$  и  $n_q'$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой

выступающий нуклеотид;

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

модификации N<sub>b</sub> отличаются от модификации Y, а модификации N<sub>b</sub>' отличаются от модификации Y'; и

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

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

В одном варианте осуществления заболевание представляет собой заболевание, связанное с компонентом комплемента C5. В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, выбрано из группы, состоящей из ночной пароксизмальной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (RA), синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS), болезни плотного осадка (DDD), оптиконевромиелита (NMO), мультифокальной моторной нейропатии (MMN), рассеянного склероза (MS); дегенерации желтого пятна (например, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдрома, включающего гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP-синдром); пурпуры тромботической тромбоцитопенической (ТТР); спонтанной потери плода; пауци-иммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении, болезни холодовых агглютининов, дерматомиозита буллезного

пемфигоида, связанного с Шига-подобным токсином *E. coli* гемолитико-уремического синдрома, С3-нефропатии, васкулита, связанного с антителами к цитоплазме нейтрофилов; реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальными и сосудистыми механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, аллогенной трансплантации, сепсиса, заболевания коронарной артерии, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, сепсиса, связанного с системным воспалительным ответом, септического шока, травмы спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистых нарушений, миокардита, цереброваскулярного нарушения, периферических сосудистых нарушений, реноваскулярной гипертензии, нарушений брыжеечных/кишечных сосудов, васкулита, нефрита Шенлейна-Геноха, васкулита, связанного с системной красной волчанкой, васкулита, связанного с ревматоидным артритом, васкулита, связанного с иммунными комплексами, болезни Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Kawasaki (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, вращательной атерэктомии, перепончатой нефропатии, синдрома Гийена-Барре и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA). В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH). В еще одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

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

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента

комплемента C5 на фрагменты C5a и C5b. В другом варианте осуществления антитело к компоненту комплемента C5 представляет собой экулизумаб.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту путем внутривенной инфузии.

В другом варианте осуществления экулизумаб вводят субъекту подкожно.

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

приблизительно 50 мг/кг.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления dsRNA конъюгирована с лигандом.



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

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

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

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

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, включающими приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, содержащую участок комплементарности, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной

последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи и практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими лигандами на 3'-конце; и поддержание клетки, полученной на первой стадии в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена C5, тем самым ингибируя экспрессию гена C5 в клетке.

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

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

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, содержащим смысловую



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

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

красной волчанкой, васкулита, связанного с ревматоидным артритом, васкулита, связанного с иммунными комплексами, болезни Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Kawasaki (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, вращательной атерэктомии, перепончатой нефропатии, синдрома Гийена-Барре и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA). В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH). В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

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

чем приблизительно 300 мг.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии C5 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по



меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, тем самым ингибируя экспрессию C5 у субъекта.

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

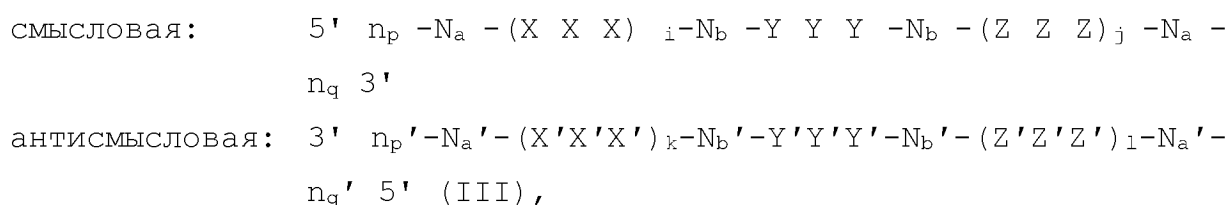
В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, содержащего смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный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

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

В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение.

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

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



где

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

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

каждый из  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой

олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0–25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

этого.

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

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

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

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

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

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

300 мг приблизительно каждые две недели после этого.

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

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

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

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

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

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

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

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

осуществления средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту два раза в месяц.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Краткое описание графических материалов**

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

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

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

Фигура 4 представляет собой график, показывающий процентную долю компонента комплемента C5, оставшуюся у мышей линии C57BL/6

через 48 часов после разовой дозы 10 мг/кг указанных иРНК.

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

На фигуре 5В представлены данные вестерн-блоттинга, показывающие количество компонента комплемента С5, оставшееся на день 7 у крыс после разового подкожного введения АД-58642 в дозе 2,5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

Фигуры 6А и 6В представляют собой графики, показывающие процентную долю компонента комплемента С5, оставшуюся у мышей линии С57BL/6 через 5 дней после разовой дозы АД-58642 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

Фигуры 7А и 7В представляют собой графики, показывающие процентную долю гемолиза, оставшуюся на 5-й день у мышей линии С57BL/6 после разовой дозы АД-58642 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

На фигуре 8 представлены данные вестерн-блоттинга, показывающие количество компонента комплемента С5, оставшееся на день 5 у мышей линии С57BL/6 после разовой дозы АД-58642 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг.

Фигура 9 представляет собой график, показывающий количество белка компонента комплемента С5, оставшееся на день 5 и 9 в сыворотке мышей после разовой дозы АД-58641 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в ходе анализа показан в виде пунктирной линии.

Фигура 10 представляет собой график, показывающий количество белка компонента комплемента С5, оставшееся на день 8 в сыворотке мышей после введения АД-58641 в дни 0, 1, 2, и 3 в дозе 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг или 2,5 мг/кг. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в ходе анализа показан в виде пунктирной линии.

На фигурах 11А и 11В показана эффективность и кумулятивный эффект повторного введения соединения АД-58641 у крыс. Фигура 11А представляет собой график, показывающий гемолитическую

активность, сохранившуюся в сыворотке крыс на день 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25 и 32 после повторного введения в дозе 2,5 мг/кг/доза или 5,0 мг/кг/доза, q2w x3 (два раза в неделю в течение 3 недель). На фигуре 11В представлены данные вестерн-блоттинга, показывающие количество белка компонента комплемента C5, оставшегося в сыворотке животных.

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

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

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

Фигура 15 представляет собой график, показывающий процентную долю белка компонента комплемента C5, оставшуюся на день 5 в сыворотке мышей линии C57BL/6 после разовой дозы 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг или 2,0 мг/кг указанных иРНК. Фигура 16 представляет собой график, показывающий процентную долю белка компонента комплемента C5, оставшуюся в сыворотке мышей линии C57BL/6 на день 6, 13, 20, 27 и 34 после разовой дозы 1 мг/кг указанных иРНК.

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

На фигуре 18А показана последовательность нуклеотидов



компонента комплемента 5 (C5) *Homo sapiens* (SEQ ID NO:1); на фигуре 18B показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Macaca mulatta* (SEQ ID NO:2); на фигуре 18C показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Mus musculus* (SEQ ID NO:3); на фигуре 18D показана последовательность нуклеотидов компонента комплемента 5 (C5) *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO:4); на фигуре 18E показано обратное дополнение SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:5); на фигуре 18F показано обратное дополнение SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO: 6); на фигуре 18G показано обратное дополнение SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:7); и на фигуре 18H показано обратное дополнение SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO:8).

### **Подробное описание изобретения**

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

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

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

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

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

Комбинированная терапия по настоящему изобретению включает введение субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, средства RNAi по настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к компоненту комплемента C5, например, экулизумаба. Комбинированные терапии по настоящему изобретению снижают уровень C5 у субъекта (например, приблизительно на 30%, 35%,

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

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

#### **I. Определения**

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

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

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

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

Применяемый в данном документе "компонент комплемента C5", используемый взаимозаменяемо с выражением "C5", относится к хорошо известному гену и полипептиду, также известному в данной

области техники как CRAMD4, C3- и PZR-подобной белок, содержащий домен альфа-2-макроглобулина, аналог анафилотоксина C5a, гемолитический комплемент (Hc) и единица комплемента C5. Последовательность транскрипта мРНК C5 человека можно найти, например, в GenBank, № GI: 38016946 (NM\_001735.2; SEQ ID NO: 1). Последовательность мРНК C5 макака можно найти, например, в GenBank, № GI: 297270262 (XM\_001095750.2; SEQ ID NO:2). Последовательность мРНК C5 мыши можно найти, например, в GenBank, № GI: 291575171 (NM\_010406.2; SEQ ID NO:3). Последовательность мРНК C5 крысы можно найти, например, в GenBank, № GI: 392346248 (XM\_345342.4; SEQ ID NO:4). Дополнительные примеры последовательностей мРНК C5 легко доступны в публичных базах данных, например, GenBank.

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

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

Целевая последовательность может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов в длину, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину. Например, целевая последовательность может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18,

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

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

Каждый из G, "C," "A," "T" и "U" , как правило, означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако, будет понятно, что выражение "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, который подробнее описан ниже, или имитирующий нуклеотид заменяющий фрагмент (см, например, таблица 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без изменения в значительной степени свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, описанных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любой точке олигонуклеотида могут быть замещены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначного спаривания оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении.

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

В одном варианте осуществления средство RNAi по настоящему изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК C5, с направлением отщепления целевой РНК. Не желая привязываться к теории, считают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе III типа фермент, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК (siRNA), образованной внутри клетки, и которая способствует образованию RISC-комплекса с осуществлением сайленсинга целевого гена, т.е. гена C5. Соответственно, выражение "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

В другом варианте осуществления средство RNAi может быть

одноцепочечной siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные средства RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью в комплексе RISC, который затем отщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Строение и испытание одноцепочечных siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, полное содержание каждого из которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно использовать в качестве одноцепочечной siRNA, которая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150;:883-894.

В другом варианте осуществления "иРНК" для применения в композициях, применениях и способах по настоящему изобретению является двухцепочечной РНК и в данном документе ее называют "двухцепочечным средством RNAi", "молекулой двухцепочечной РНК (dsRNA)", "средством, представляющим собой dsRNA" или "dsRNA". Выражение "dsRNA" означает комплекс молекул рибонуклеиновых кислот с дуплексной структурой, содержащий две встречно-параллельные и, по сути, комплементарные цепи нуклеиновых кислот, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию по отношению к целевой РНК, т.е. гену С5. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению двухцепочечная РНК (dsRNA) запускает расщепление целевой РНК, например, мРНК через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

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

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

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

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



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

В одном варианте осуществления средство RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК C5, направляя отщепление целевой РНК. Не желая привязываться к теории, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе III типа фермент, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Применяемое в данном документе выражение "нуклеотидный выступ" относится к по меньшей мере одному неспаренному нуклеотиду, который выпячивается из дуплексной структуры иРНК, например, dsRNA. Например, когда 3'-конец одной цепи dsRNA

выходит за пределы 5'-конца другой цепи или *vice versa*, существует нуклеотидный выступ. dsRNA может содержать выступ по меньшей мере одного нуклеотида; альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять или более нуклеотидов. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может находиться на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах, либо антисмысловой, или смысловой цепи dsRNA.

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

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

Выражение "антисмысловая цепь" или "направляющая цепь" означает цепь иРНК, например, dsRNA, которая включает участок, который, по сути, комплементарен целевой последовательности, например, мРНК C5. Применяемое в данном документе выражение "участок комплементарности" относится к участку антисмысловой цепи, который, по сути, комплементарен последовательности, например целевой последовательности, например, последовательности нуклеотидов, C5, как определено в данном

документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, несовпадения могут присутствовать во внутренних или концевых участках молекулы. Как правило, наиболее приемлемые несовпадения располагаются в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца иРНК.

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

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

Применяемое в данном документе, и если не указано иное, выражение "комплементарный" при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, где жесткие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов

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

Комплементарные последовательности в пределах иРНК, например, в пределах dsRNA, описанных в данном документе, включают спаренные основания олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащие первую нуклеотидную последовательность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащую вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут быть отнесены к "полностью комплементарным" по отношению друг к другу в данном документе. Однако, когда первую последовательность в данном документе характеризуют как "по сути, комплементарную" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя способность к гибридизации при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена через путь RISC. Однако, когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько одноцепочечных выступов, то такие выступы не будут считаться несовпадениями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид с длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид с длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

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

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

Применяемый в данном документе полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), означает полинуклеотид, который, по сути, комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей С5). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК С5 если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей С5.

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

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению

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

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

Применяемый в данном документе "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая приматов (таких как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), не-приматов (таких как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птиц (например, утка или гусь). В одном варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, подвергаемый лечению или диагностике заболевания, нарушения или состояния, при которых снижение экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие; человек, имеющий риск развития заболевания, нарушения или состояния, при которых снижение экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие; человек, переносящий заболевание, нарушение или состояние, при

которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие; и/или человек подвергаемый лечению заболевания, нарушения или состояния, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, как описано в данном документе.

Применяемые в данном документе выражения "осуществлять лечение" или "лечение" относятся к полезному или желаемому результату, включая без ограничения ослаблению или облегчению одного или нескольких симптомов, связанных с нежелательной активацией пути комплемента (например, гемолиза и/или хронического воспаления); уменьшению степени нежелательной активации пути комплемента; стабилизации (т.е., без ухудшения) состояния хронического воспаления и/или гемолиза; облегчению или временному ослаблению нежелательной активации пути комплемента (например, хронического воспаления и/или гемолиза), что либо установлено, либо не установлено. "Лечение" также может означать продление жизни по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

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

Применяемое в данном документе "предотвращение" или "осуществление профилактики", используемое в отношении заболевания, нарушения или его состояния, при которых снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, относится к снижению вероятности того, что у субъекта будет развиваться симптом, связанный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптом нежелательной активации

комплемента, например, хроническое воспаление, гемолиз и/или тромбоз. Вероятность развития тромбоза снижается, например, когда у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска к развитию тромбоза, либо не развивается тромбоз, или тромбоз развивается в меньшей степени тяжести по отношению к популяции, имеющей те же факторы риска и не получающей лечение, как описано в данном документе. Неспособность развития заболевания, нарушения или состояния, или снижение развития симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере на приблизительно 10% по клинически принятой шкале для этого заболевания или нарушения), или демонстрацию запаздывающих симптомов с опозданием (например, дни, недели, месяца или года) считается эффективным предотвращением.

Применяемое в данном документе выражение "болезнь, связанная с компонентом комплемента C5" представляет собой заболевание или нарушение, которое вызвано или связано с активацией комплемента. Такие заболевания, как правило, связаны с воспалением и/или активацией иммунной системы, например, лизисом, опосредованным атакующим мембрану комплексом, анафилаксией и/или гемолизом. Неограничивающие примеры заболеваний, связанных с компонентом комплемента C5, включают ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), астму, ревматоидный артрит (RA), синдром антифосфолипидных антител, волчаночный нефрит, ишемически-реперфузионное повреждение, типичный или инфекционный гемолитико-уремический синдром (tHUS), болезнь плотного осадка (DDD), оптиконевромиелит (NMO), мультифокальную моторную нейропатию (MMN), рассеянный склероз (MS); дегенерацию желтого пятна (например, связанная с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдром, включающий гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP-синдром); пурпуру тромбоцитическую тромбоцитопеническую (ТТР); спонтанную потерю плода; пауци-иммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; преэклампсию, черепно-мозговую травму, миастению, болезнь холодовых агглютининов, дерматомиозит буллезный пемфигоид,



связанный с Шига-подобным токсином *E. coli* гемолитико-уремический синдром, СЗ-нефропатию, васкулит, связанный с антителами к цитоплазме нейтрофилов (например, гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как гранулематоз Вегенера), синдром Черджа-Стросс и микроскопический полиангиит); реакции отторжения трансплантата, вызванные гуморальными и сосудистыми механизмами, дисфункцию трансплантата, инфаркт миокарда (например, повреждение тканей и ишемия при инфаркте миокарда), аллогенную трансплантацию, сепсис (например, неблагоприятный исход сепсиса), заболевания коронарной артерии, дерматомиозит, болезнь Грейвса, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, сепсис, связанный с системным воспалительным ответом, септический шок, травма спинного мозга, гломерулонефрит, тиреоидит Хашимото, диабет I типа, псориаз, пузырчатку, аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), ИТР, синдром Гудпасчера, болезнь Дегоса, антифосфолипидный синдром (APS), катастрофический APS (CAPS), сердечно-сосудистые нарушения, миокардит, цереброваскулярные нарушения, периферические (например, опорно-двигательного аппарата) сосудистые нарушения, реноваскулярную гипертензию, нарушения брыжеечных/кишечных сосудов, васкулит, нефрит Шенлейна-Геноха, васкулит, связанный с системной красной волчанкой, васкулит, связанный с ревматоидным артритом, васкулит, связанный с иммунными комплексами, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь Кавасаки (артериит), венозную газовую эмболию (VGE) и рестеноз после установки стента, вращательную атерэктомия, перепончатую нефропатию, синдром Гийена-Барре и чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology* 41:147-152; публикация патента США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой ночную пароксизмальную гемоглобинурию (PNH). PNH может быть классической PNH или PNH в условиях синдрома недостаточности другого костного мозга и/или миелодиспластического синдрома

(MDS), например, цитопении. В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента C5, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

## **II. иРНК по настоящему изобретению**

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

dsRNA включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизованы с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будут применяться. Одна цепь dsRNA (антисмысловая цепь) содержит участок комплементарности который, по сути, является комплементарным, и, как правило, полностью комплементарный целевой последовательности. Целевая последовательность может быть получена из последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена C5. Другая цепь (смысловая цепь) содержит участок, который является комплементарным антисмысловой цепи, при этом две цепи

гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в данном документе и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде комплементарных себе участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, вместо того, чтобы располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

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

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

В некоторых вариантах осуществления dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 20 нуклеотидов в длину, или от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину. В общем, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно в данной области техники, dsRNA с длиной более, чем

приблизительно 21-23 нуклеотидов в длину, могут служить субстратами для Dicer. Как также будет понятно обычному специалисту, участок РНК, представляющий собой цель для отщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. Где это уместно, "частью" мРНК-мишени является непрерывная последовательность целевой мРНК достаточной длины, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного отщепления (т.е., отщепление через путь RISC).

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексный участок является основной функциональной частью dsRNA, например, дуплексный участок от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления до того момента, пока участок подвергается обработке в функциональный дуплекс из, например, 15-30 пар оснований, что направляет желаемую РНК для отщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок больше, чем 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляют собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, применяемое для нацеливания на экспрессию C5, не образуется в целевой клетке путем расщепления большей dsRNA.

dsRNA, описанная в данном документе, может дополнительно

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

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

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

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидных последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая цепь выбрана из группы последовательностей, представленной в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, и антисмысловая цепь, соответствующая смысловой цепи, выбрана из группы последовательностей из любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей, по сути, комплементарна

последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена С5. Таким образом, в этом аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, а второй олигонуклеотид описан как антисмысловая цепь, соответствующая смысловой цепи, в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

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

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из приблизительно 20 и 23 пар оснований, например, 21 пара оснований, были расценены как особенно эффективные в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, было обнаружено, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вариантах осуществления, описанных выше, в силу характера олигонуклеотидных последовательностей, представленных в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, описанные в данном документе dsRNA могут содержать по меньшей мере одну цепь длиной в 21 нуклеотид минимально. Разумно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, минус только несколько нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть одинаково эффективны по

сравнению с dsRNAs, описанными выше. Следовательно, dsRNA, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена C5 не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования в сравнении с dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются в пределах объема по настоящему изобретению.

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

В то время как целевая последовательность, как правило, составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину, существует большое разнообразие в пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направления расщепления любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, обеспечивают руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" данного размера (в качестве не лимитирующего примера, 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, в кремнии), размещены на последовательности целевой РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Перемещая

постепенно "окно" последовательности одного нуклеотида выше или ниже начального положения целевой последовательности, может быть идентифицирована следующая потенциальная целевая последовательность, пока полный набор возможных последовательностей не определен для любого данного целевого выбранного размера. Этот способ в сочетании с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, как описано в данном документе, или как известно в данной области техники) для идентификации тех последовательностей, которые действуют оптимально, может идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании со средством, представляющим собой иРНК, опосредуют лучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, в то время как последовательности идентифицированы, например, в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23 представлены эффективные целевые последовательности, предполагается, что дальнейшая оптимизация эффективности ингибирования может быть осуществлена путем постепенного "перемещением окна" одного нуклеотида выше или ниже заданных последовательностей для идентификации последовательностей с одинаковыми или улучшенными характеристиками ингибирования.

Кроме того, предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, дополнительную оптимизацию можно достичь путем систематического либо добавления, или удаления нуклеотидов с образованием более длинных или более коротких последовательностей и проверки тех последовательностей, образованных в результате перемещения окна более длинного или более короткого размера вверх или вниз по целевой РНК с этой точки. Опять же, присоединение данного подхода к образованию новых целей у кандидатов с тестированием эффективности иРНК на основе тех целевых последовательностей в анализе ингибирования, известными в данной области техники и/или как описано в данном документе, может привести к дальнейшему повышению эффективности ингибирования. В продолжение, такие оптимизированные последовательности можно корректировать путем, например,



введения модифицированных нуклеотидов, как описано в данном документе или как известно в данной области техники, добавлением или изменением выступа или другими модификациями, известными в данной области техники и/или описанных в данном документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, увеличение стабильности в сыворотке или периода полувыведения из кровотока, увеличение термостабильности, улучшение трансмембранной доставки, нацеливание на конкретное положение или тип клетки, увеличение взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, увеличение высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

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

### **III. Модифицированные иРНК по настоящему изобретению**

В одном варианте осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, dsRNA, является

немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, dsRNA, является химически модифицированной для повышения стабильности или других полезных характеристик. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения практически все из нуклеотидов иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все из нуклеотидов иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. иРНК по настоящему изобретению, в которых "практически все нуклеотиды модифицированы" являются в значительной степени, но не полностью модифицированными и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов.

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

содержащие модифицированные остовы включают, среди прочего, те, которые не содержат атом фосфора в остове. В контексте данного описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в их межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК будет содержать атом фосфора в ее межнуклеозидном остове.

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

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

Остовы модифицированной РНК, которые не включают атом фосфора, представляют собой остовы, которые образуются межнуклеозидными связями коротких алкильных или циклоалкильных

цепей, смешанными межнуклеозидными связями гетероатомов и алкильных или циклоалкильных цепей, или межнуклеозидными связями одной или нескольких более коротких гетероатомных или гетероциклических цепей. Они включают те, которые имеют морфолино-связи (формируются частично из части нуклеозида, представляющей собой сахар); силоксановые остовы; сульфид, сульфоксидные и сульфоновые остовы; ацетиловые и тиоацетиловые остовы; метилен-ацетиловые и тиоацетиловые остовы; алкен-содержащие остовы; сульфаматные остовы; метилен-имино и метилен-гидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, включающие смешанные составные части N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5034506, 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; и 5677439, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие РНК-миметики для применения в иРНК, в которой и связь сахара, и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных единиц, заменяются новыми группами. Единицы оснований поддерживают в течение гибридизации с целевым соединением соответствующей нуклеиновой кислоты. Одно из таких олигомерных соединений, РНК-миметик, которое продемонстрировало прекрасные характеристики гибридизации, называют пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA, остов сахара в РНК замещают амид-содержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняют и связывают прямо или косвенно с атомами азота аза-группы амидной части остова. Иллюстративные патенты США, которые описывают получение соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082, 5714331, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством

ссылки. Дополнительные соединения РНА, подходящие для применения в иРНК по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и, в частности,  $--CH_2--NH--CH_2--$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$  [известный как метиленовый (метилимно) или остов MMI],  $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$  и  $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$  [где родной фосфодиэфирный остов представлен как  $--O--P--O--CH_2--$ ] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, описанные в данном документе, имеют структуру морфолино-остова, как в вышеупомянутом патенте США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных фрагментов, представляющих собой сахара. иРНК например, dsRNA, описанные в данном документе, могут включать один из следующих заместителей в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилом или C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m равняется от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA включают один из следующих заместителей в положении 2': C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил либо O-аралкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино-, поли алкиламино-, замещенный силил, группа расщепления РНК, "репортерная" группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств иРНК, или группа для улучшения фармакодинамических свойства иРНК, и другие заместители, обладающие подобными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или

2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) т.е., алкокси-алкокси- группу. Другая иллюстративная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ , также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е., 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

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

иРНК также может включать модификации или замещения азотистого основания (часто называемого в данной области техники просто как "основание"). Применяемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" азотистые основания включают пуриновые основания аденина (A) и гуанина (G), и пиримидиновые основания тимина (T), цитозина (C) и урацила (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как дезокси-тимин (dT), 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин

и 2-тиоцитозин, 5-галоген урацил и цитозин, 5-пропинил урацил и цитозин, 6-азо урацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил анал и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные соединения урацила и цитозина, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные азотистые основания включают те, которые описаны в патенте США № 3687808, которые описаны в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; которые описаны в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, которые описаны *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613 и которые описаны Sanghvi, Y S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих азотистых оснований особенно полезны для увеличения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Замещения 5-метилцитозина продемонстрировали увеличение стабильности дуплекса нуклеиновой кислоты при 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и являются иллюстративными замещениями оснований, еще более предпочтительно в комбинации с модификацией сахара 2'-O-метоксиэтил.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение некоторых из выше указанных модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований включают без ограничения указанные выше патенты США №№ 3687808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711;

5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617;  
 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197;  
 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062;  
 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; и 7495088, полное содержание  
 каждого из которых включено в данный документ посредством  
 ссылки.

РНК из числа иРНК также могут быть модифицированы с включением одной или нескольких замкнутых нуклеиновых кислот (LNA). Замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий фрагмент модифицированной рибозы, где фрагмент рибозы содержит дополнительный мост, соединяющий 2'-и 4'- атомы углерода. Эта структура эффективно "замыкает" рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Добавление замкнутых нуклеиновых кислот в siRNA продемонстрировало повышение стабильности siRNA в сыворотке и снижение эффектов не целевого действия (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение нуклеотидов с замкнутыми нуклеиновыми кислотами, включают без ограничения следующие: патенты США №№ 6268490, 6670461, 6794499, 6998484, 7053207, 7084125 и 7399845, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциальные стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N- (ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННАс), N- (капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N- (ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННАс), тимидин-2'-0- дезокситимидин (эфир), N- (аминокапроил) -4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докосаноил-уридин-3"- фосфат, инвертированное основание dT(idT) и др. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации РСТ № WO 2011/005861.

*А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы, по настоящему изобретению*

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухцепочечные средства RNAi по настоящему изобретению включают средства с



химическими модификациями, которые раскрыты, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в заявке PCT/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которой включено в данный документ посредством ссылки.

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

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

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

длину, от 17 до 23 нуклеотидов в длину, от 17 до 21 нуклеотида в длину, от 17 до 19 нуклеотидов в длину, от 19 до 25 нуклеотидов в длину, от 19 до 23 нуклеотидов в длину, от 19 до 21 нуклеотида в длину, от 21 до 25 нуклеотидов в длину или от 21 до 23 нуклеотидов в длину.

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

В одном варианте осуществления средство RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может составлять 1-6 нуклеотидов в длину, например, 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Выступы могут быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или того, что две нити одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других линкеров, не являющихся основаниями.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства RNAi независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том

числе, без ограничения, с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Teo), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Aeo), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, TT может быть выступающей последовательностью для любого конца на любой цепи. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность.

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

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

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

содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

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

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи. В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, между концевыми тремя нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи

между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-O-метилом или 3'-фтором, например, при чередующемся мотиве. Необязательно средство RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc<sub>3</sub>).

В одном варианте осуществления средство RNAi содержит смысловую и антисмысловую цепь, где смысловая цепь составляет 25-30 нуклеотидных остатков в длину, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), позиции с 1 до 23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь составляет 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в позициях, спаренных с позициями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи представляет собой неспаренный со смысловой цепью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотида являются неспаренными со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой цепью, тем самым образуя 5'-одноцепочечный выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой цепи, при этом смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь достаточно комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой цепи в длину для уменьшения экспрессии целевого гена при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по

меньшей мере один из мотивов происходит в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

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

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

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

Для средства RNAi с дуплексным участком, составляющим 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи находится обычно приблизительно в 10, 11 и 12 положении от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях;

11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи или отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка RNAi от 5'-конца.

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

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления цепи или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланкирующей модификацией. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части цепи, который отделен от мотива в сайте расщепления той же цепи или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, тогда химические структуры могут быть одинаковыми или отличными. Могут

присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, когда присутствует две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может находиться на одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в сайте расщепления или рядом с ним или с обеих сторон ведущего мотива.

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

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

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

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

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



два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, могут быть модифицированы. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или различной модификацией, которая может включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных атомов кислорода фосфата и/или одного или нескольких связанных атомов кислорода фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полное замещение фосфатного фрагмента на "дефосфоризованные" линкеры; модификацию или замещение встречающегося в природе основания и замещение или модификацию рибознофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты являются полимерами из субъединиц, то многие из модификаций встречаются в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или несвязанного O фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера, модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевой нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может встречаться в двухцепочечном участке, в одноцепочечном участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухцепочечном участке РНК или может встречаться только в одноцепочечном участке РНК. Например, модификация фосфотиоата в несвязанном положении O может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевой нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может встречаться в двухцепочечном и одноцепочечном участках, в частности на конце. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Это может быть возможно, например, для повышения

стабильности, для включения конкретных оснований в выступы или для включения модифицированных нуклеотидов или нуклеотидных заместителей в одноцепочечные выступы, например, в 5'- или 3'-выступ или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступе могут быть модифицированы, например, при помощи модификаций, описанных в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара при помощи модификаций, которые известны в данной области, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор- (2'-F) или 2'-O-метил-модифицированных вместо рибозного сахара азотистого основания, и модификации фосфатной группы, например, модификации фосфотиоата. Выступы могут не быть гомологичными с целевой последовательностью.

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

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

В одном варианте осуществления N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", применяемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной цепи. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один на каждые два нуклеотида, или один на каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABV...",

"АВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.д.

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

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

модификации, а 1 положение в антисмысловой цепи может начинаться с 2'-O-метил-модификации.

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

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N<sub>a</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>N<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, а "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>", который отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или различными модификациями. В качестве альтернативы, N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать, когда присутствует фланкирующая модификация.

Средство RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой цепи, или антисмысловой цепи, или обеих цепей в любом положении в цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне.

Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой цепи может характеризоваться сдвигом относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления двухцепочечное средство RNAi содержит 6–8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце и две фосфотиоатных межнуклеотидных связи на 3'-конце, и смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеотидных связи либо на 5'-конце, или 3'-конце.

В одном варианте осуществления RNAi имеет модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, может быть по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Эти концевые три нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи и/или 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи и между концевыми тремя нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими

нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство RNAi может дополнительно иметь две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи.

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

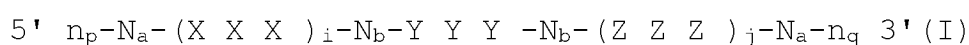
В одном варианте осуществления средство RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранную из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и несовпадающих пар, например, неканонических или отличных от канонических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

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

участке от 5'-конца антисмысловой цепи является парой оснований AU.

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

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



где

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

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

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

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

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

где  $N_b$  и  $Y$  имеют неодинаковую модификацию; и

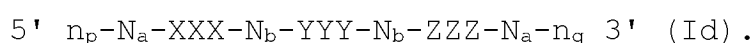
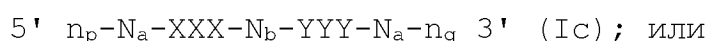
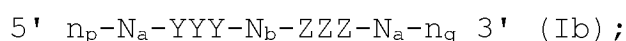
каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно, в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

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

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, если средство RNAi содержит дуплексный участок, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив YYY может находиться в сайте

расщепления или вблизи него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

В одном варианте осуществления  $i$  равняется 1, а  $j$  равняется 0, или  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 1, или как  $i$ , так и  $j$  равняются 1. Смысловая цепь, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



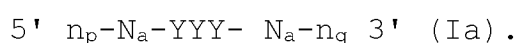
В тех случаях, когда смысловая цепь представлена формулой (Ib),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

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

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

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

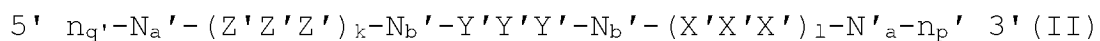
В других вариантах осуществления  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой





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

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



где

каждый из  $k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1;

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

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

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

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

где  $N_b'$  и  $Y'$  имеют неодинаковую модификацию;

и

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

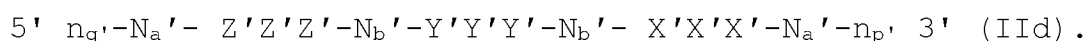
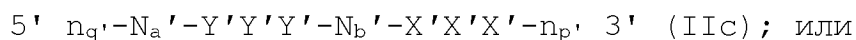
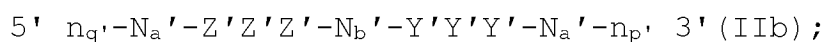
В одном варианте осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  имеет модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

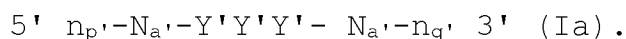


В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность,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

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

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

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



В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIa), каждая из  $N_a'$  независимо представляет собой

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

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

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

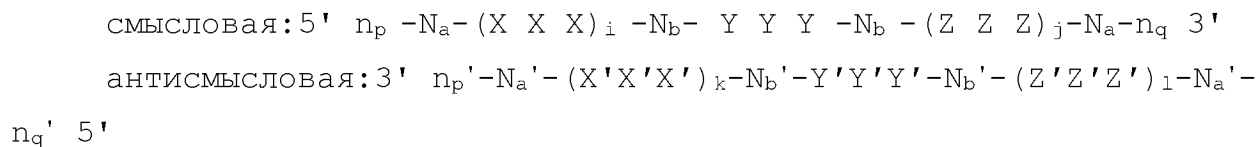
В одном варианте осуществления смысловая цепь средства RNAi может содержать мотив  $YUY$ , находящийся в 9, 10 и 11 положениях цепи, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и  $Y$  представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив  $XXX$  или мотивы  $ZZZ$  в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из  $XXX$  и  $ZZZ$  независимо представляет собой 2'-O-метил-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив  $Y'Y'Y'$ , находящийся в положениях 11, 12, 13 цепи, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и  $Y'$  представляет собой 2'-O-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив  $X'X'X'$  или мотивы  $Z'Z'Z'$  в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из  $X'X'X'$  и  $Z'Z'Z'$  независимо представляет собой 2'-O-метил-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

(IIId), соответственно.

Соответственно, средства RNAi для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая цепь содержит от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс RNAi, представленный формулой (III):



(III)

где

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

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

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

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

где

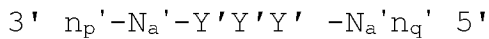
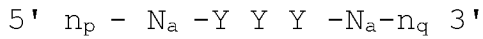
каждый из  $n_p'$ ,  $n_p$ ,  $n_q'$  и  $n_q$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; и

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

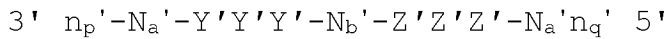
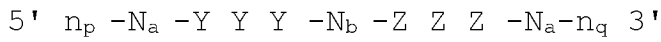
В одном варианте осуществления  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 0; или  $i$  равняется 1, а  $j$  равняется 0; или  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 1; или как  $i$ , так и  $j$  равняются 0; или как  $i$ , так и  $j$  равняются 1. В другом варианте осуществления  $k$  равняется 0, а  $l$  равняется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

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

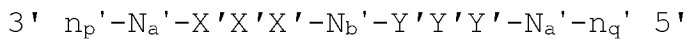
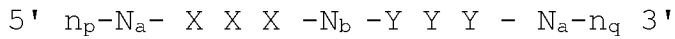
ниже:



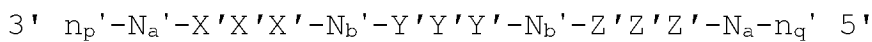
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIa), каждый из  $\text{N}_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIb), каждый из  $\text{N}_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый из  $\text{N}_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIc), каждый из  $\text{N}_b$ ,  $\text{N}_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $\text{N}_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIId), каждый из  $\text{N}_b$ ,  $\text{N}_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $\text{N}_a$ ,  $\text{N}_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10

модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

В одном варианте осуществления модификация нуклеотида  $Y$  отличается от модификации нуклеотида  $Y'$ , модификация нуклеотида  $Z$  отличается от модификации нуклеотида  $Z'$ , и/или модификация нуклеотида  $X$  отличается от модификации нуклеотида  $X'$ .

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

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

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

В одном варианте осуществления средство RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления средство RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более

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

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

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

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



например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может быть полностью насыщенным кольцевой системой или он может содержать одну или несколько двойных связей.

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

Средства RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа

выбрана из остова, представляющего собой серинол, или остова, представляющего собой диэтаноламин.

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

#### IV. иРНК, Конъюгированные с Лигандами

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

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства,

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

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

Лиганды также включают нацеливающие группы, например, нацеливающее на клетку или ткань средство, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как клетка почки. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А,

углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, витамин A, биотин или RGD-пептид, или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафин, сапфин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-0(гексадецил) глицерин, геранилксигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, O3-(олеоил)литохолевую кислоту, O3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), помощники транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин E, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеотиды (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu<sup>3+</sup> тетраазамакроциклы), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как печеночная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную глюкозу, поливалентную галактозу, N-

ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лигандом, например, может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

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

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

Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональность, такие как те, полученные из присоединения

связывающей молекулы на олигонуклеотиде (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид можно непосредственно подвергнуть взаимодействию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы с наличием любой из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связующий фрагмент, присоединенный к нему.

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

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

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

обычно применяются в синтезе олигонуклеотидов.

#### *А. Конъюгаты Липидов*

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такие липиды или липидные молекулы предпочтительно связываются с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или липидный лиганд может (а) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (с) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

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

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

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

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

#### *В. Средства, Обеспечивающие Проникновение в Клетку*

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

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную естественному пептиду. Прикрепление пептида и пептидомиметиков к средствам, представляющим собой иРНК, может повлиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, путем повышения клеточного распознавания и абсорбции. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять примерно 5-50 аминокислот в длину, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид,



амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tyr, Trp или Phe). Фрагментом, представляющим собой пептид, может быть пептид-дендример, стерически затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте фрагмент, представляющий собой пептид, может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 9). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Фрагмент, представляющий собой пептид, может быть "доставляющим" пептидом, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, как было обнаружено, последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 11) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 12) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством, представляющим собой dsRNA, посредством введенной мономерной единицы с целью нацеливания на клетку, является содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Фрагмент, представляющий собой пептид, может характеризоваться длиной в пределах от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, такой как для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно применять любую из структурных модификаций, описанных ниже.

RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и

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

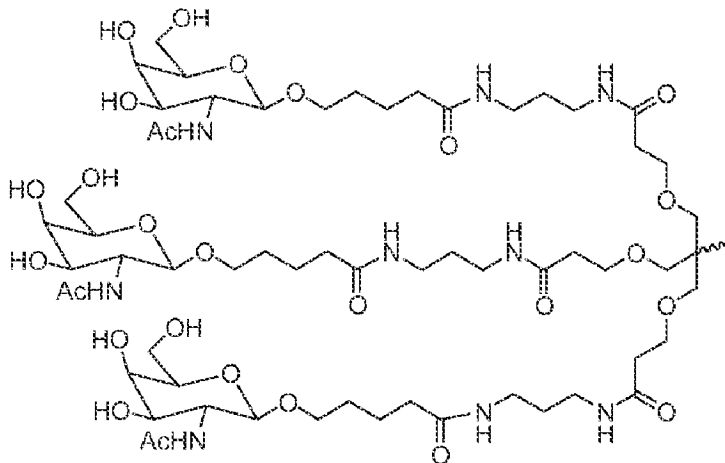
"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, например, может быть  $\alpha$ -спиральный линейный пептид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

### C. Конъюгаты Углевода

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению предлагается олигонуклеотид иРНК, дополнительно содержащий углевод. Конъюгированная с углеводом иРНК является предпочтительной для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также в композициях, пригодных для терапевтического применения *in vivo*, как описано в данном документе. Применяемый в данном документе "углевод" относится к соединению, которое является либо углеводом *per se*, состоящим из одной или нескольких единиц моносахарида, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с кислородом, азотом или атомом серы, присоединенных к каждому атому углерода; или соединению, имеющему углеводную

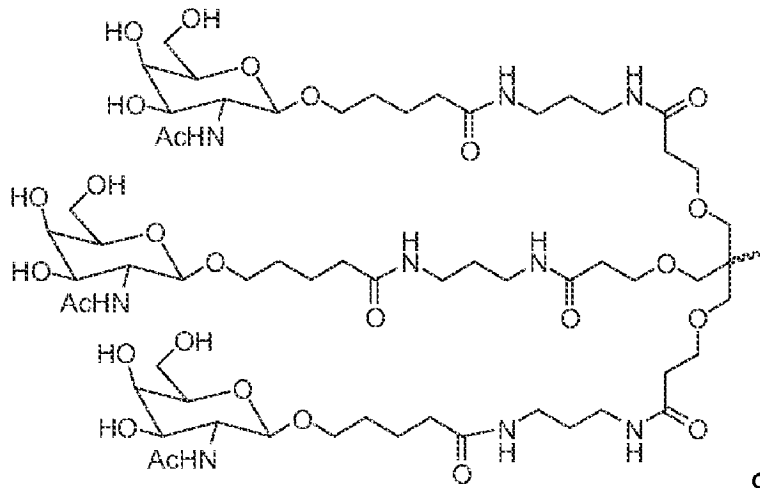
часть в качестве его части, состоящей из одной или нескольких единиц моносахарида, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с кислородом, азотом или атомом серы, присоединенных к каждому атому углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 единиц моносахарида) и полисахариды, такие как крахмалы, целлюлоза, гликоген и полисахаридные смолы. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды, включают сахара, состоящие из двух или трех единиц моносахаридов (например, C5, C6, C7 или C8).

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

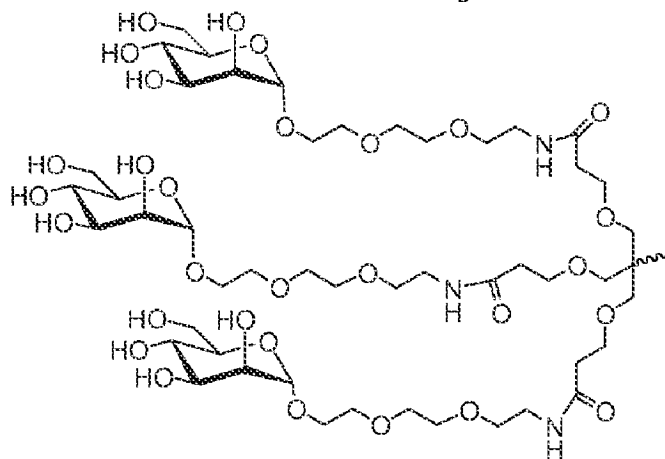


Формулы II

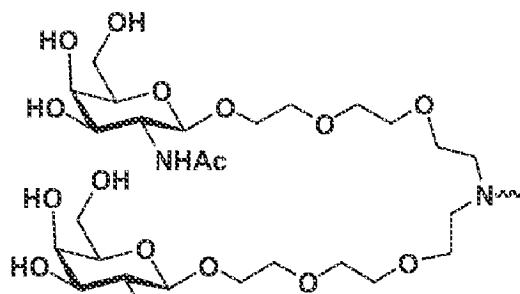
В другом варианте осуществления конъюгат углевода для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



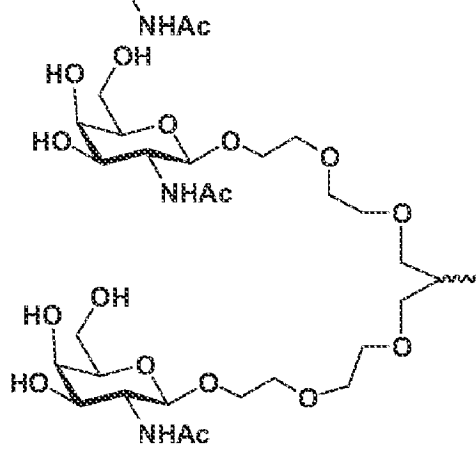
Формулы II,



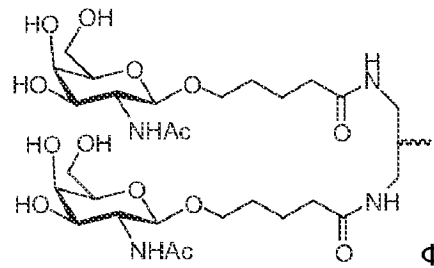
Формулы III,



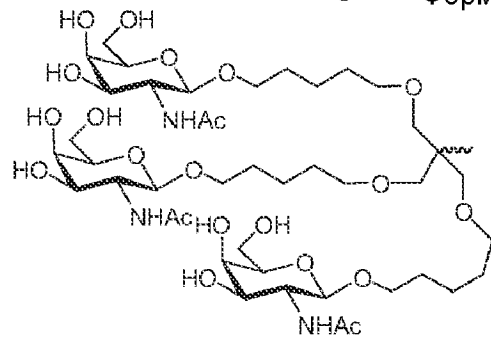
Формулы VI,



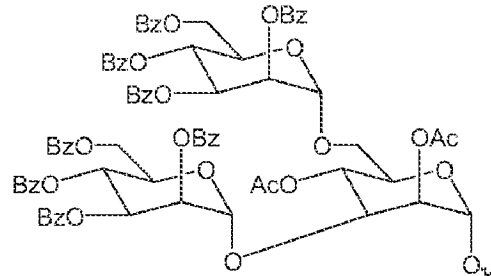
Формулы V,



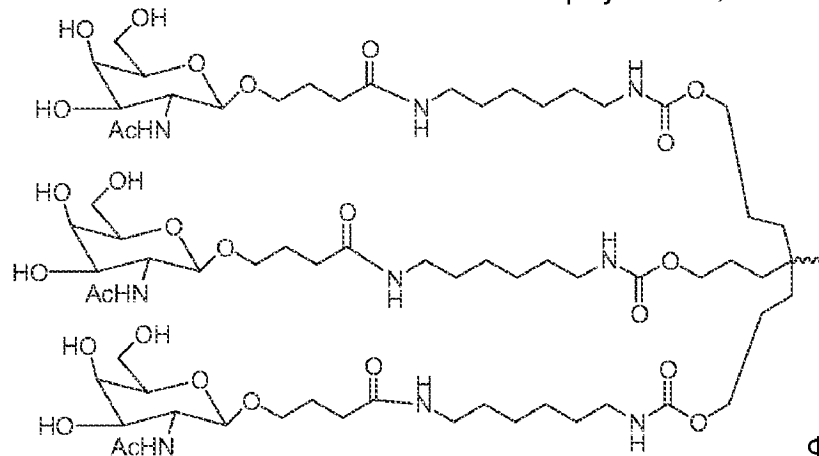
Формулы VI,



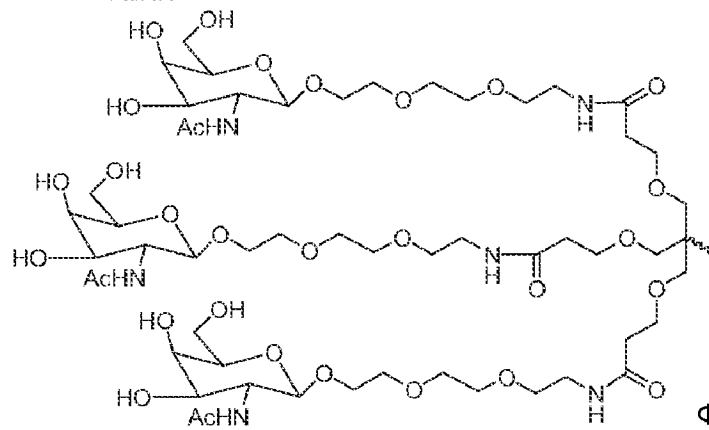
Формулы VII,



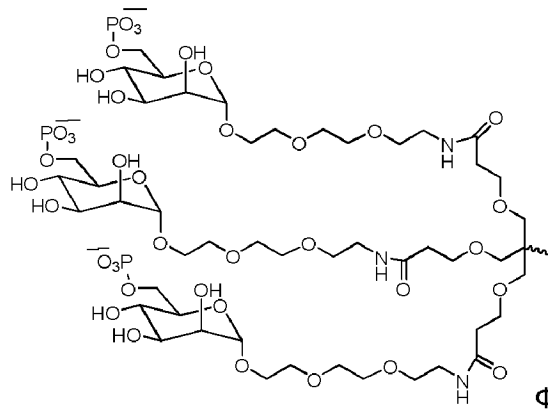
Формулы VIII,



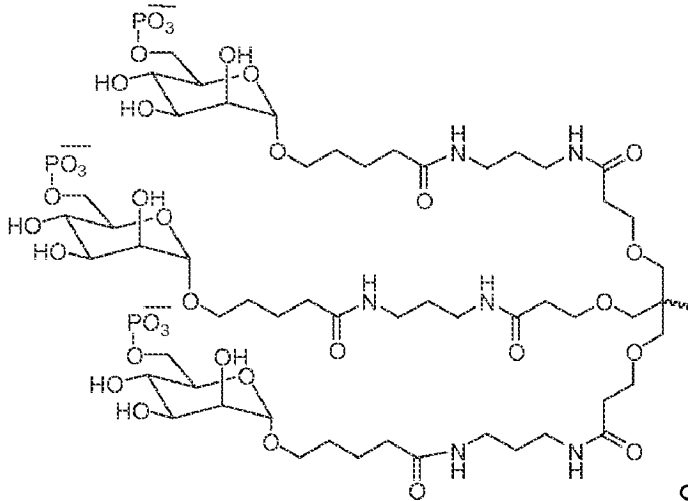
Формулы IX,



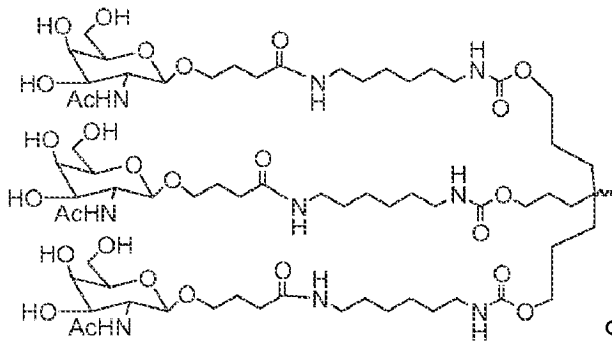
Формулы X,



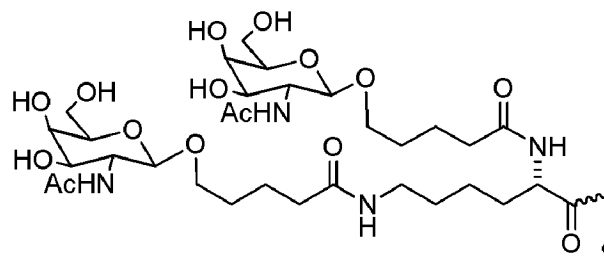
Формулы XI,



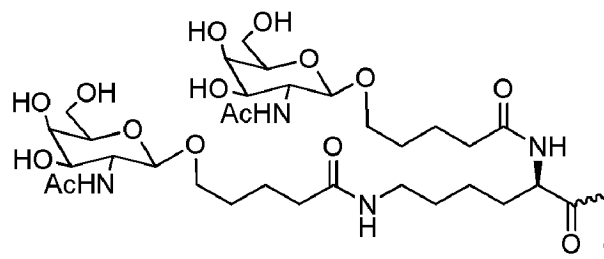
Формулы XII,



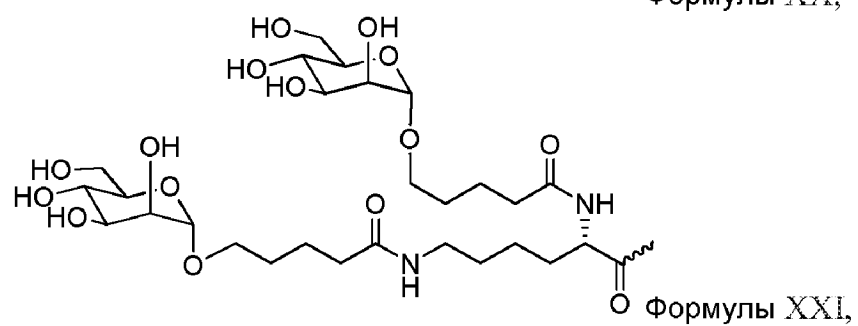
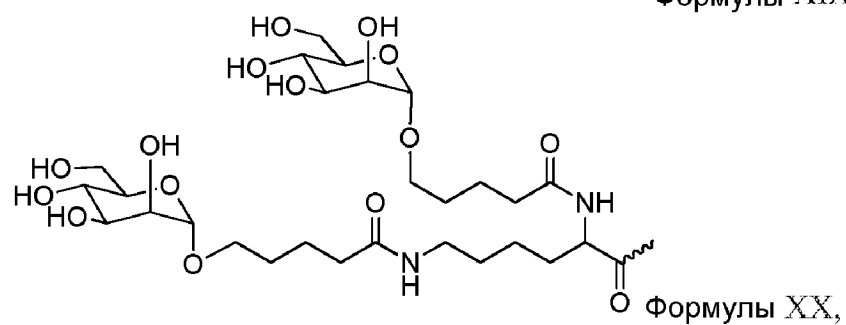
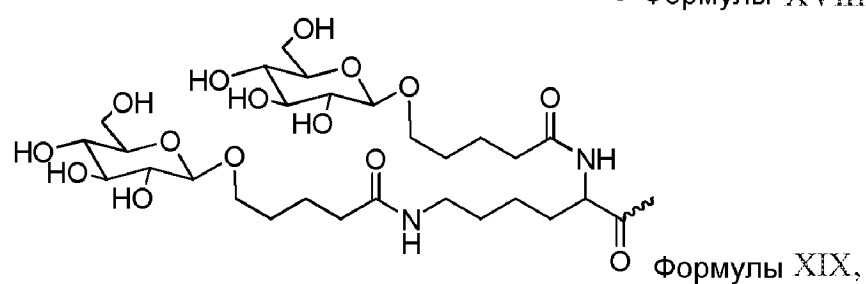
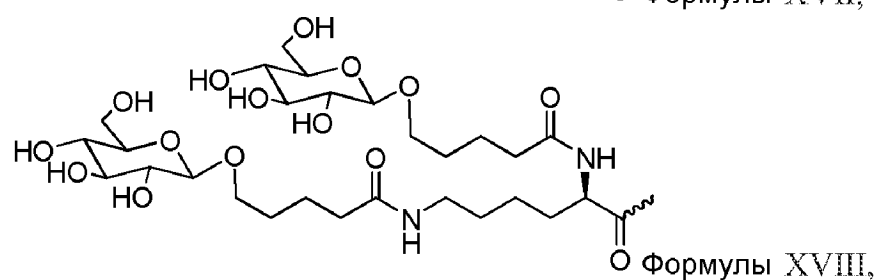
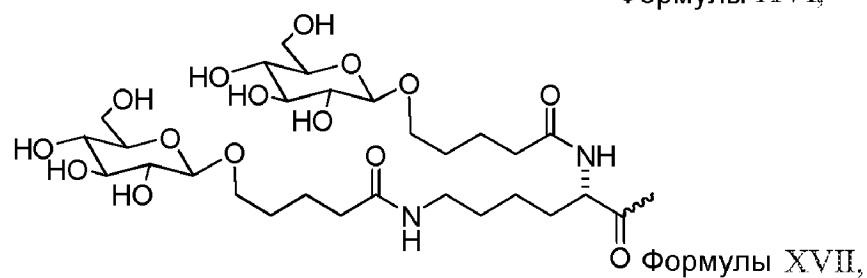
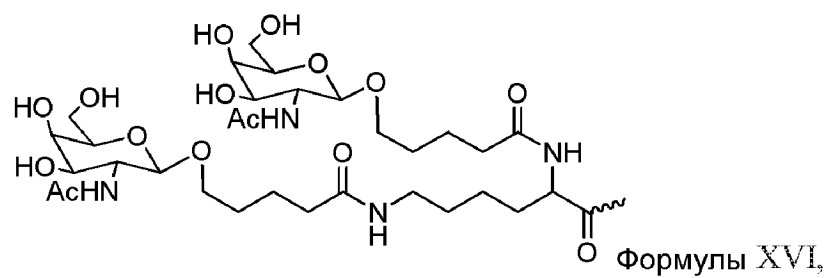
Формулы XIII,

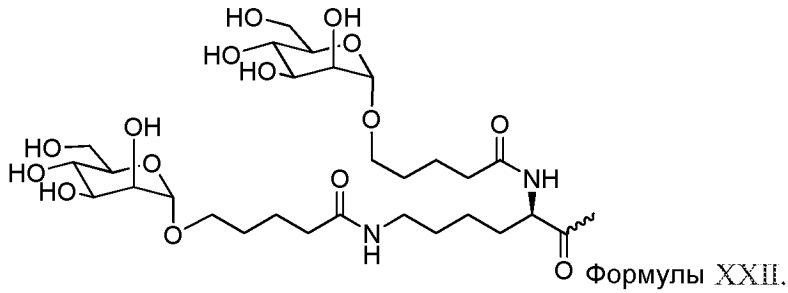


Формулы XIV,

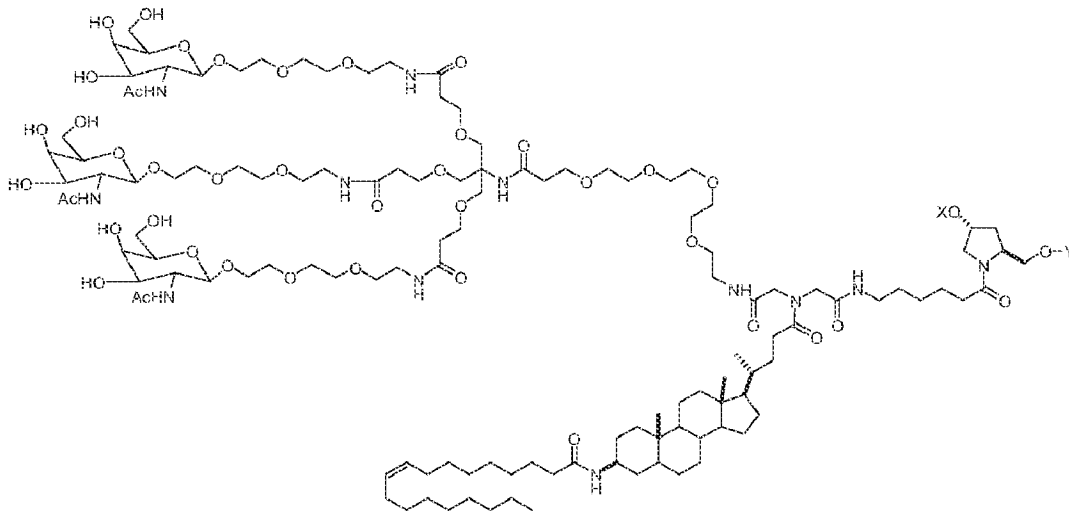


Формулы XV,





Еще один иллюстративный конъюгат углевода для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



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

В некоторых вариантах осуществления конъюгат углевода дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, как описано выше, таких как без ограничения РК-модулятор и/или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

#### D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду иРНК различными линкерами, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Выражение "линкер" или "связывающая группа" означает органическую группу, которая соединяет две части соединения, например, ковалентно прикрепляет две части соединения. Линкеры



обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как  $\text{NR}_8$ ,  $\text{C}(\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ ,  $\text{SO}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_2\text{NH}$ , или цепочку атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинил гетероциклил алкинил, алкиларил, алкениларильная, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где одна или несколько метиленовых групп могут быть прерваны или удалены по  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{S}(\text{O})$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{N}(\text{R}_8)$ ,  $\text{C}(\text{O})$ , замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл; где  $\text{R}_8$  представляет собой водород, ацил, алифатическое соединение или замещенное алифатическое соединение. В одном варианте осуществления линкер составляет между приблизительно 1-24 атомов углерода, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

Расщепляемая связывающая группа является достаточно стабильной вне клетки, но при поступлении в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая связывающая группа расщепляется по меньшей мере

приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере приблизительно в 100 раз быстрее в целевой клетке или при условии первой передачи (которое может, например, быть выбрано для имитирования или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при условии второй передачи (которое может, например, быть выбрано для имитирования или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке).

Расщепляемые связывающие группы являются чувствительными к средствам расщепления, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или наличию дегенеративных молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или обнаружены на более высоких уровнях или активности внутри клеток, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких дегенеративных средств включают: восстанавливающие средства, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не имеют субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительную расщепляемую связывающую группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, способные создать кислую среду, например, те, которые приводят к рН пять или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушить кислотно-расщепляемую связывающую группу, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

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

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

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

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

*i. Окислительно-восстановительные расщепляемые связывающие группы*

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

*ii. i. Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата*

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером

средства, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются  $-O-P(O)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(S)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(S)(SRk)-O-$ ,  $-S-P(O)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(O)(ORk)-S-$ ,  $-S-P(O)(ORk)-S-$ ,  $-O-P(S)(ORk)-S-$ ,  $-S-P(S)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(O)(Rk)-O-$ ,  $-O-P(S)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(O)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(S)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(O)(Rk)-S-$ ,  $-O-P(S)(Rk)-S-$ . Предпочтительные варианты осуществления представляют собой  $-O-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(SH)-O-$ ,  $-S-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(OH)-S-$ ,  $-S-P(O)(OH)-S-$ ,  $-O-P(S)(OH)-S-$ ,  $-S-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(H)-O-$ ,  $-O-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-O-$ ,  $-S-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-S-$ ,  $-O-P(S)(H)-S-$ . Предпочтительный вариант осуществления представляет собой  $-O-P(O)(OH)-O-$ . Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

*iii. i. Кислотно-расщепляемые связывающие группы*

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

*iv. Связывающие группы на основе сложного эфира*

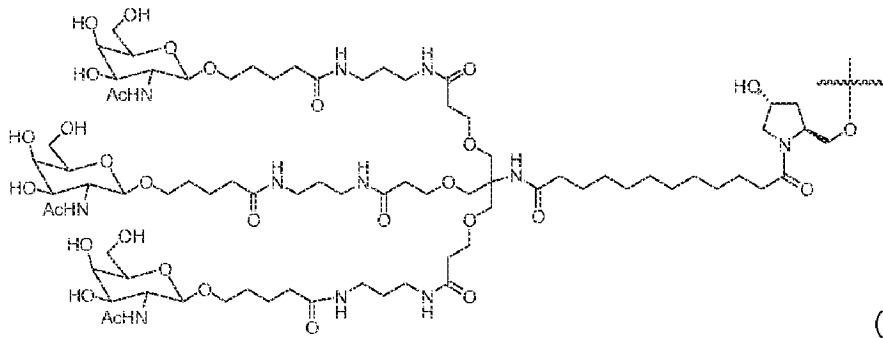
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложного эфира включают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

*v. Расщепляемые группы на основе пептида*

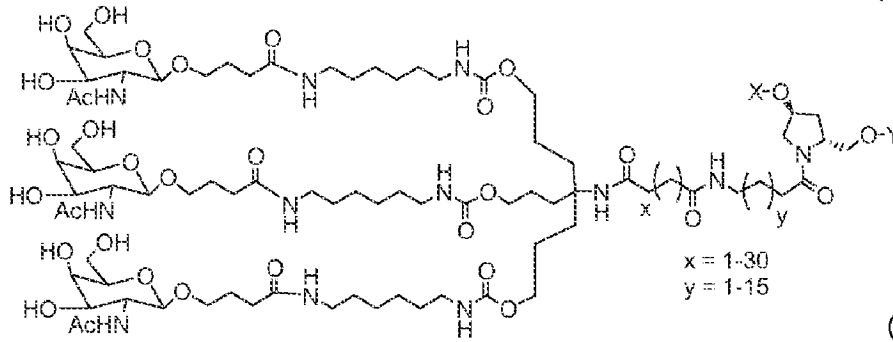
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая связывающая группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представляют собой пептидные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

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

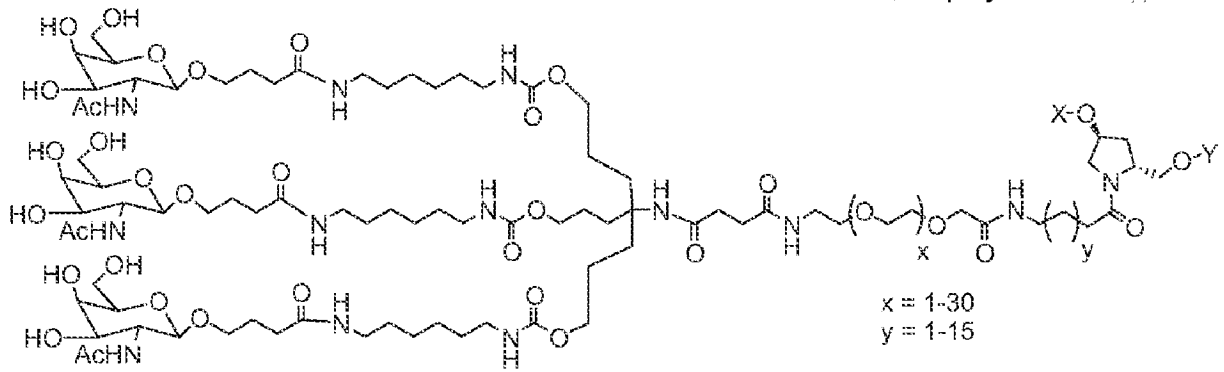
ограничения



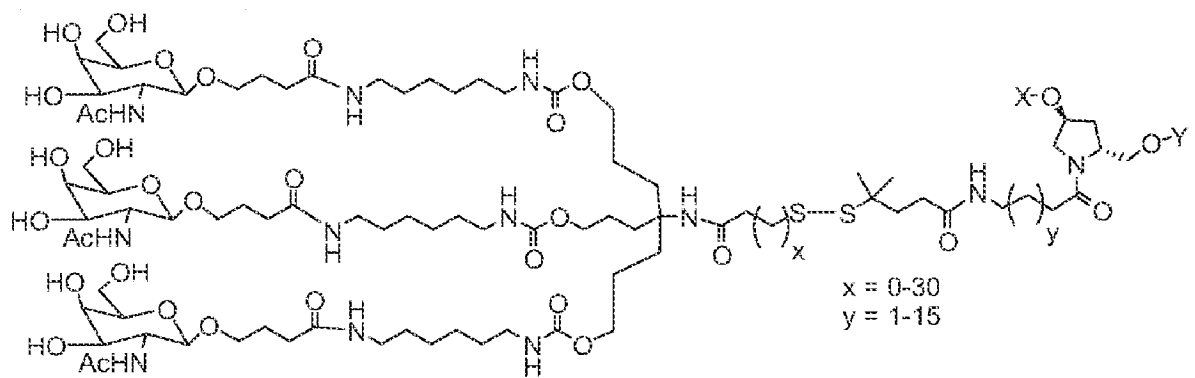
(Формулы XXIV),



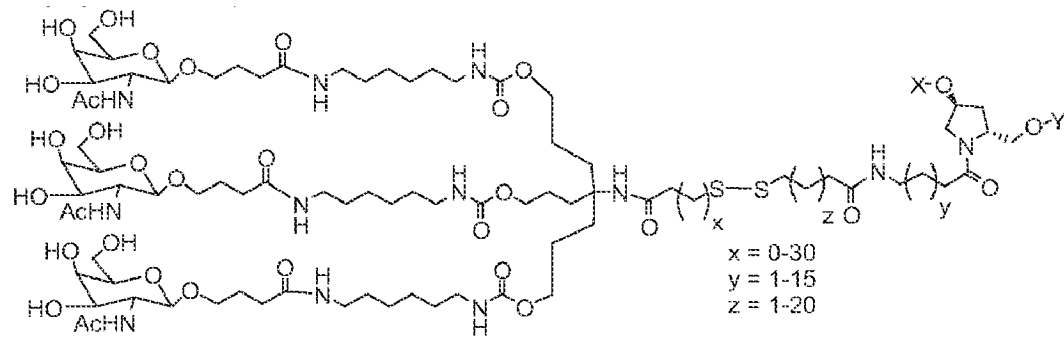
(Формулы XXV),



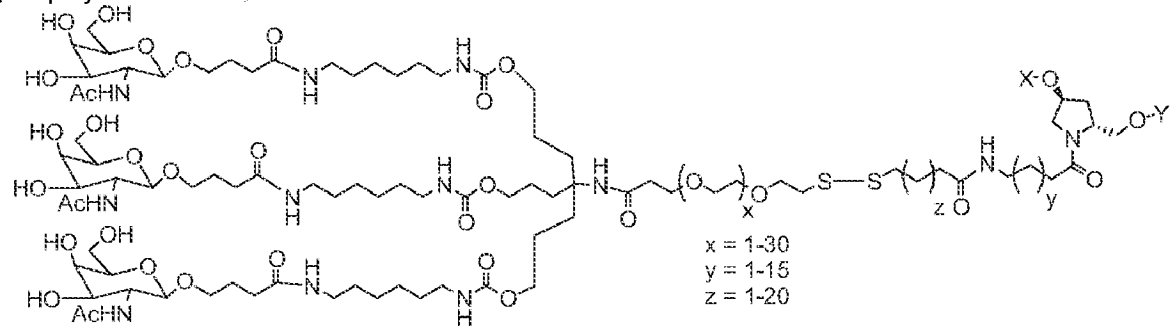
(Формулы XXVI) ,



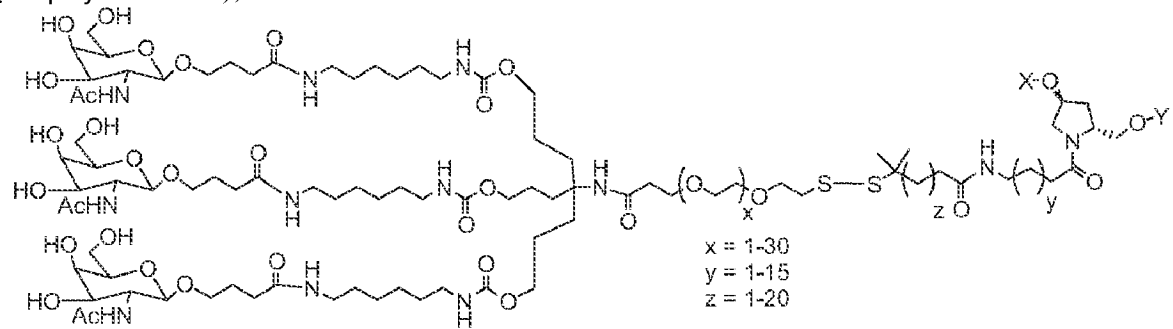
(Формулы XXVII),



(Формулы XXVIII),



(Формулы XXIX), и



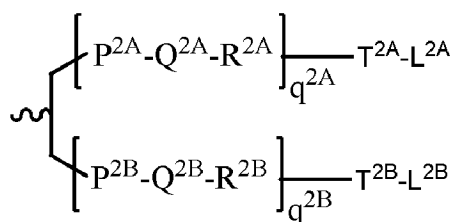
(формулы XXX), где один из Y или X представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

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

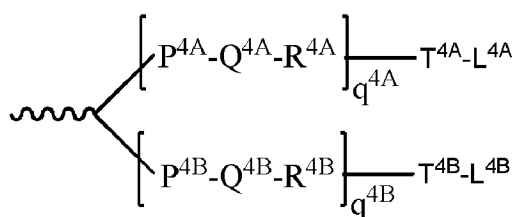
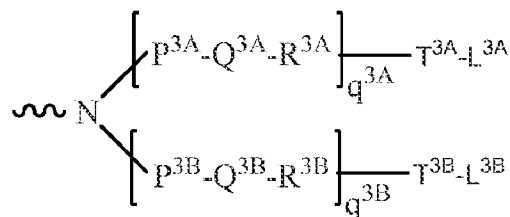
В одном варианте осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, продемонстрированных в любой из формул (XXXI) - (XXXIV):



Формулы XXXI

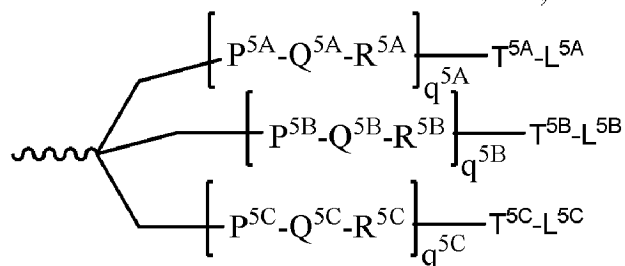


Формулы XXXII



Формулы XXXIII

, или



Формулы XXXIV

;

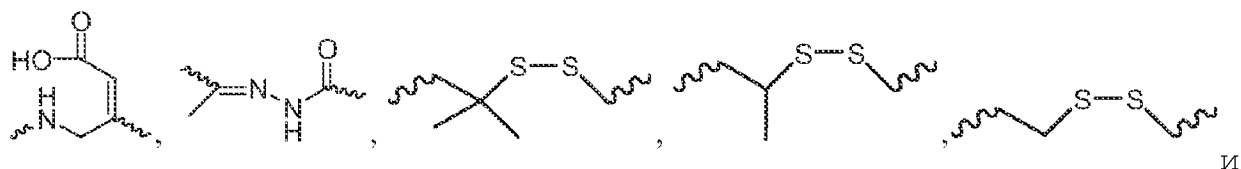
где

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

каждый из  $R^{2\text{A}}$ ,  $R^{2\text{B}}$ ,  $R^{3\text{A}}$ ,  $R^{3\text{B}}$ ,  $R^{4\text{A}}$ ,  $R^{4\text{B}}$ ,  $R^{5\text{A}}$ ,  $R^{5\text{B}}$ ,  $R^{5\text{C}}$ ,  $T^{2\text{A}}$ ,  $T^{2\text{B}}$ ,  $T^{3\text{A}}$ ,  $T^{3\text{B}}$ ,  $T^{4\text{A}}$ ,  $T^{4\text{B}}$ ,  $T^{4\text{A}}$ ,  $T^{5\text{B}}$ ,  $T^{5\text{C}}$  независимо для каждого случая отсутствует, переставляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

$Q^{2\text{A}}$ ,  $Q^{2\text{B}}$ ,  $Q^{3\text{A}}$ ,  $Q^{3\text{B}}$ ,  $Q^{4\text{A}}$ ,  $Q^{4\text{B}}$ ,  $Q^{5\text{A}}$ ,  $Q^{5\text{B}}$ ,  $Q^{5\text{C}}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

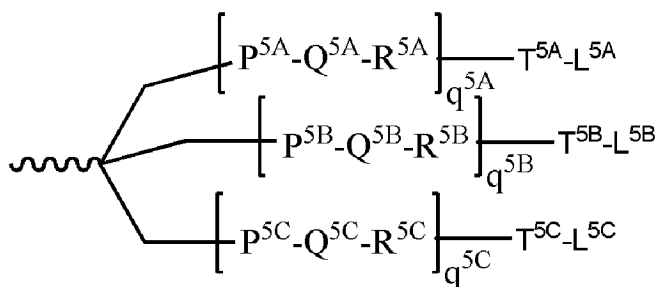
каждый из  $R^{2\text{A}}$ ,  $R^{2\text{B}}$ ,  $R^{3\text{A}}$ ,  $R^{3\text{B}}$ ,  $R^{4\text{A}}$ ,  $R^{4\text{B}}$ ,  $R^{5\text{A}}$ ,  $R^{5\text{B}}$ ,  $R^{5\text{C}}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O),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



ли гетероциклил;

$L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т.е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (например, GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и  $R^a$  представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc особенно полезны для применения со средствами RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как представлены формулой (XXXV):

#### Формула XXXV



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

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

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение конъюгатов РНК включают без ограничения патенты США №№ 4828979, 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136;

5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469;  
5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098;  
5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475;  
5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142;  
5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928  
и 5688941, 6294664, 6320017, 6576752, 6783931, 6900297, 7037646,  
8106022, полное содержание каждого из которых включено в данный  
документ посредством ссылки.

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

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

области техники.

В некоторых случаях РНК из числа иРНК может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, были конъюгированы с иРНК в целях повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, способы выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включали липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-тримитилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантан-уксусная кислота (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или октадециламин или фрагмент гексиламино-карбонилноксистерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты США, которые описывают получение таких конъюгатов РНК, были перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих amino-линкер в одном или нескольких положениях последовательности. Аминогруппа затем реагирует с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего сочетания или активирующих реагентов. Реакцию конъюгирования можно выполнять как с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, или после расщепления РНК в фазе раствора.

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

#### IV. Доставка иРНК по настоящему изобретению

Доставку иРНК по настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, страдающий заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с иРНК по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения композиции, содержащей иРНК, например, dsRNA, субъекту. В альтернативном случае, доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Такие альтернативные случаи описаны далее ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с иРНК по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Что касается доставки *in vivo*, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставленной молекулы, предупреждение неспецифического действия и накопление доставленной молекулы в целевой ткани. Неспецифическое действие иРНК может быть сведено к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы иРНК. Несколько исследований показали эффективный нокдаун генных продуктов при введении иРНК локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF путем как инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов

(Tolentino, MJ., et al (2004) *Retina* 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждает образование новых сосудов в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолью (Kim, WJ., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., et al (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). РНК-интерференция также была успешной при локальной доставке к ЦНС путем непосредственной доставки (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и к легким путем интраназального введения (Howard, KA., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Vitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Что касается введения иРНК системно при лечении заболевания, РНК может быть модифицирована или, в качестве альтернативы, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа действуют для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции с иРНК на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательного нецелевого действия. Молекулы иРНК могут быть модифицировать при помощи химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, иРНК, направленную против АроВ и конъюгированную с фрагментом, представляющим собой липофильный холестерин, вводили системно мышам и получали в результате нокдаун мРНК ароВ как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгация иРНК с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышечных

моделях рака предстательной железы (McNamara, JO., et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления иРНК можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы иРНК (отрицательно заряженной) и также увеличивают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть связанными либо с иРНК, либо на них воздействуют для образования пузырька или мицеллы (см., например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себя иРНК. Образование пузырьков или мицелл также предупреждает разрушение иРНК при введении системно. Способы получения и введения катионных комплексов с иРНК находятся в пределах квалификации специалистов в данной области техники (см., например, Sorensen, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN., et al (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS., et al (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY., et al (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME., et al (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA., et al (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления иРНК образуют комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в

патенте США № 7427605, который включен в данный документ при помощи ссылки в полном объеме.

*А. Кодированные вектором иРНК по настоящему изобретению*

иРНК, нацеленные на ген С5, могут экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную РСТ публикацию № WO 00/22113, Conrad, международную РСТ публикацию № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (приблизительно от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых тканей или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансгены также могут быть сконструированы с возможностью наследования их в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные цепи или цепи иРНК могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования) для экспрессирования двух отдельных цепей с получением, например, dsRNA В альтернативном случае, каждая отдельная цепь dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, таким образом, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

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



эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из ряда коммерческих источников. Обычно предусмотрены векторы, содержащие удобные сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих иРНК, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в желательную целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии иРНК в виде комплекса с носителями-катионными липидами (например, олигофектаминол) или носителями на основе некаатионных липидов (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для типов иРНК-опосредованного нокдауна, нацеленного на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки хозяина можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить при помощи репортера, такого как флуоресцентный маркер, к примеру, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена при помощи маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гигромицину В.

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

основе вируса осповакцины, или авипокс, например, канарипокс или оспы кур; и (j) желпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы с нарушенной репликацией. Различные векторы будут или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. Для обеспечения экспрессии иРНК в целевых клетках в конструкциях для рекомбинантной экспрессии иРНК, как правило, требуется наличие регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и т.д. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, описаны далее ниже.

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

Экспрессия иРНК может быть точно регулируемой, например, путем использования индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty *et al.*, 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование при помощи экдизона, при помощи эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопрропил-бета-D-тиогалактопиранозиды (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена иРНК.

Могут быть использованы вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК. Например, возможно применение ретровирусного вектора (см. Miller *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Такие ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки

вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Boesen *et al.*, *Biotherapy* 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам большей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для применения в доставке иРНК по настоящему изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов к респираторному эпителию. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для основанных на аденовирусах системах доставки являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышца. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. Vout и соавт., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) показали использование аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макак-резус. Дополнительные примеры использования аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992);

Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); публикации PCT WO94/12649 и Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Подходящий AV вектор для экспрессии иРНК, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно использовать для доставки иРНК по настоящему изобретению (Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном варианте осуществления иРНК может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одноцепочечных молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AV вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R *et al.* (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помощи ссылки.

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

Тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замены различных вирусных капсидных белков, в случае необходимости. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т.п. AAV-векторы можно создать для нацеливания на различные

клетки путем конструирования векторов так, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J E et al. (2002), *J Virol* 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ при помощи ссылки.

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

#### V. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению

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

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

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", применяемая в данном документе, означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, инертный наполнитель, вспомогательные вещества (например, смазывающее вещество, тальк, магний, стеарат кальция или цинка, или стеариновая кислота) или растворяющее инкапсулирующее вещество, участвующие в переносе и транспортировке в указанного соединения от одного органа или

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

Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, пригодны для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью гена C5, например, заболевания, связанного с компонентом комплемента C5. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC) или внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в

головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена С5. Как правило, приемлемая доза иРНК по настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на разовую дозу.

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

В другом варианте осуществления dsRNA вводят в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 50 мг/кг, от







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

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

В другом варианте осуществления dsRNA вводят в дозе от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 30 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 40 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 45 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до



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

Например, можно вводить субъекту, например, подкожно или внутривенно, разовое терапевтическое количество иРНК, приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4,

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

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят, например, подкожно или внутривенно, несколько доз терапевтического количества иРНК, например, в дозе приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Многодозный режим может включать введение терапевтического количества иРНК ежедневно, например, в течение двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней или дольше.

В других вариантах осуществления субъекту вводят, например, подкожно или внутривенно, повторную дозу терапевтического количества иРНК, например, в дозе приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375,

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

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

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или иРНК можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня, или даже при помощи непрерывной инфузии, или доставки посредством состава с контролируемым высвобождением. В таком случае, количество иРНК,

содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить общую суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение иРНК в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно удобны для доставки средств в определенный участок, как, например, таких, которые возможно применять со средствами по настоящему изобретению. В таком варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее кратное число суточной дозы.

В других вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления по настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят каждые два месяца.

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

Достижения в области генетики мышей обеспечили ряд мышинных

моделей для изучения различных заболеваний человека, как, например, нарушения, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем снижения экспрессии C5. Такие модели можно использовать для проведения *in vivo* исследований иРНК, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в данной области и включают, например, мышиную модель коллаген-индуцированного артрита (Courtenay, J.S., et al. (1980) *Nature* 283, 666-668), ишемии миокарда (Homeister JW и Lucchesi BR (1994) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:17-40), мышиную модель астмы, индуцированной яичным белком (например, Tomkinson A., et al. (2001). *J. Immunol.* 166, 5792-5800), (NZB×NZW)F1, MRL/Fas<sup>lpr</sup> (MRL/lpr) и мышиную модель BXSB (Theofilopoulos, A. N. и Kono, D. H. 1999. Murine lupus models: gene-specific and genome-wide studies. In Lahita R. G., ed., *Systemic Lupus Erythematosus*, 3rd edn, p. 145. Academic Press, San Diego, CA), мышиную модель aHUS (Goicoechea de Jorge et al. (2011) Развитие атипичного гемолитического уремического синдрома зависит от компонента C5, *J Am Soc Nephrol* 22:137-145).

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

иРНК можно доставлять таким образом, чтобы происходило целенаправленное воздействие на конкретную ткань, как, например, печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази,



лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. могут быть необходимы или желательны. Также можно применять покрытые презервативы, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают те, в которых иРНК, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоил фосфатидилэтанолламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеоил фосфатидилэтанолламин (DOTMA)). иРНК, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы, иРНК могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, без ограничения, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C<sub>1-20</sub>алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмиристетат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

*А. Составы с иРНК, содержащие мембранные молекулярные ансамбли*

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

Применяемое в данном документе выражение "липосома" относится к пузырьку, состоящему из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные пузырьки, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию с иРНК. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию с иРНК, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту приложения действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, при применении липосом к тканям бислоем липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает иРНК, доставляется в клетку, где иРНК может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления иРНК в конкретные типы клеток.

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

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например,

соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать pH для содействия конденсации.

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

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

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

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

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

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-

стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu *et al.* *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4(6) 466).

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

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

содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al).

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

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

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

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

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

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

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Как сообщалось, липополизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным при трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, известны проявлением более низкой токсичности и обеспечением более эффективной трансфекции, чем DOTMA содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие

катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

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

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

Липосомы, которые включают иРНК, могут быть получены с высокой способностью деформироваться. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше, чем средний радиус липосомы. Например, типом деформируемых



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

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

Трансферсомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью деформироваться, они являются перспективными кандидатами как средства доставки лекарственных средств. Трансферсомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферсомы являются приспособляющимися к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, зачастую достигают мишеней без деления на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферсом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы использовали для

доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

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

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

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты,

как, например, омыляющие вещества, ациллактилаты, ациламида аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

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

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

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

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

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные

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

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

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

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который находится под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-

вытеснителя становятся одной, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствует две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением части содержимого, например, посредством дозирующего клапана. Распыляемая доза фармацевтического средства выталкивается из дозирующего клапана в виде мелкодисперсной струи.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметилвый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

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

#### *В. Липидные частицы*

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

Применяемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липида. LNP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который приведен в РСТ публикации № WO 00/03683. Частицы по настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 150 нм, чаще от примерно 60 нм до примерно 130 нм, чаще от примерно 70 нм до примерно 110 нм, наиболее часто от примерно 70 нм до примерно 90 нм и по сути

являются нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновой кислоты-липиды по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновой кислоты-липиды и способ их получения раскрыт, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и PCT публикации № WO 96/40964.

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

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

дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR, 5s, 6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-(2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц липид-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки.

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

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеилфосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от примерно 5 мол.% до примерно 90 мол.%, примерно 10 мол.% или

примерно 58 мол.%, если холестерин включен, от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

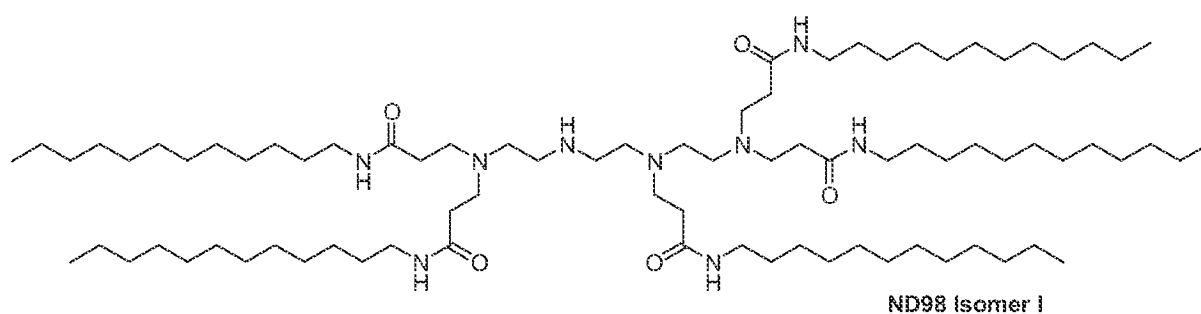
Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе, без ограничения, PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять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

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

В одном варианте осуществления липидоид ND98·4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастицы липид-dsRNA (т.е. частиц LNP01). Маточные растворы каждого в этаноле могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла примерно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла примерно 100-300 мМ. Наночастицы липид-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечением по размеру в 100 нм) при помощи, например, экструдера с термоцилиндром, как, например, Lipex



Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, при помощи диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например, забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) с pH примерно 7, например, pH примерно 6,9, pH примерно 7,0, pH примерно 7,1, pH примерно 7,2, pH примерно 7,3 или pH примерно 7,4.



Формула I

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

Дополнительные иллюстративные составы с липидом-dsRNA описаны в таблице 1.

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/ конъюгат PEG-липид Соотношение липид:sirRNA
SNALP -1	1,2-дилиноленилокси-N,N- диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/P EG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:sirRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG- cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:sirRNA ~ 7:1

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

LNP12	1,1'- (2- (4- (2- ( (2- (бис (2- гидроксидодецил) амино) этил) (2-гидроксидодецил) амино) этил) пиперазин-1-ил) этилазанедиил) дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 33:1
LNP14	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:sirNA: 11:1
LNP15	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:sirNA: 11:1
LNP16	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 7:1
LNP17	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 10:1
LNP18	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 12:1
LNP19	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:sirNA: 8:1
LNP20	МС3	МС3/DSPC/хол/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 7:1

LNP22	XTC	XTC/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:sirNA: 10:1
-------	-----	---

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

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

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

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

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

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

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

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

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

*Синтез ионизируемых/катионных липидов*

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

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

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

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

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

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое

является либо насыщенным, ненасыщенным, либо ароматическим и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизирован, в том числе бициклические кольца, в которых любой из вышеперечисленных гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, которые определены ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропримидинил, тетрагидротииофенил, тетрагидротииопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротииофенил, тетрагидротииопиранил и т.п.

Выражения "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксо-заместителя (=O) замещаются два атома водорода. В связи с этим, заместители включают оксо, галоген, гетероцикл, -CN, -OR<sub>x</sub>, -NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>C(=O)R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>y</sub>, -C(=O)R<sub>x</sub>, -C(=O)OR<sub>x</sub>, -C(=O)NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -SOnR<sub>x</sub> и -SOnNR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, где n равняется 0, 1 или 2, R<sub>x</sub> и R<sub>y</sub> являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных заместителей алкила и гетероцикла дополнительно может быть замещен одним или несколькими из оксо, галогена, -OH, -CN, алкила, -OR<sub>x</sub>, гетероцикла, -NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>C(=O)R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>y</sub>, -C(=O)R<sub>x</sub>, -C(=O)OR<sub>x</sub>, -C(=O)NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -SOnR<sub>x</sub> и -SOnNR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>.

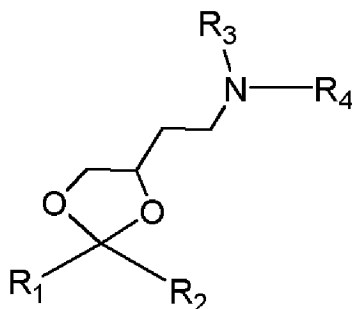
"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

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

New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную химическую активность функциональной группы. Защитную группу можно добавлять к функциональной группе для блокирования ее химической активности во время определенных реакций и затем удалять с открытием исходной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления применяют "защитную группу для спиртовой группы". "Защитная группа для спиртовой группы" представляет собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную химическую активность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять при помощи методик, хорошо известных в данной области.

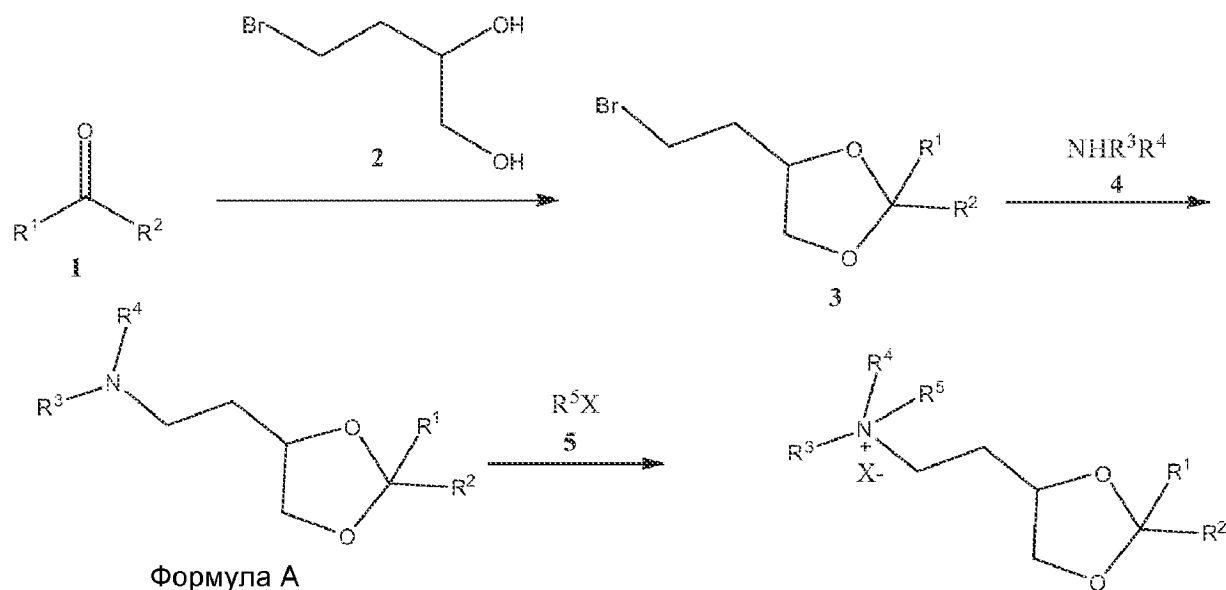
#### *Синтез формулы А*

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



где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляют собой низший алкил или R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> , могут быть совмещены для образовывания необязательно замещенного гетероциклического кольца. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС, (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). Как правило, липид формулы А, приведенной выше, может быть получен при помощи следующих схем реакций 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

Схема 1



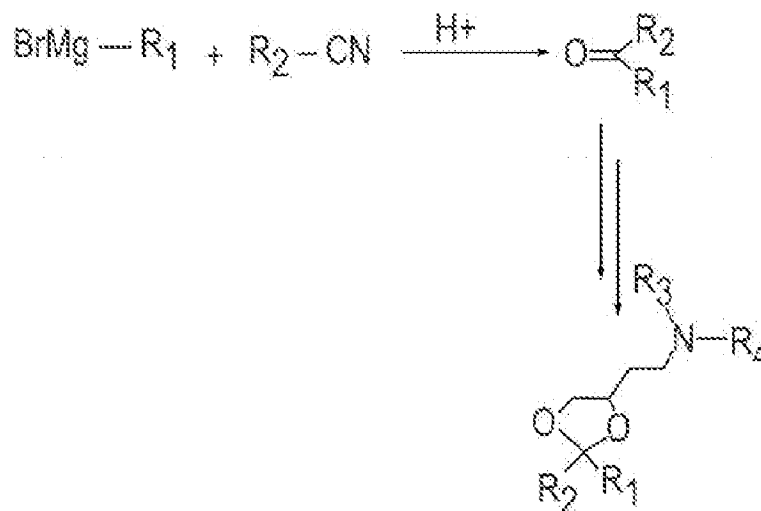
Полученный по схеме 1 липид А, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо представляют собой низший алкил или R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> могут быть совмещены для образовывания необязательно замещенного гетероциклического кольца. Кетон 1 и бромид 2 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 с амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А можно превращать в соответствующую аммонийную соль при помощи органической соли формулы 5, где X представляет собой анион, противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или т.п.

Схема 2

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



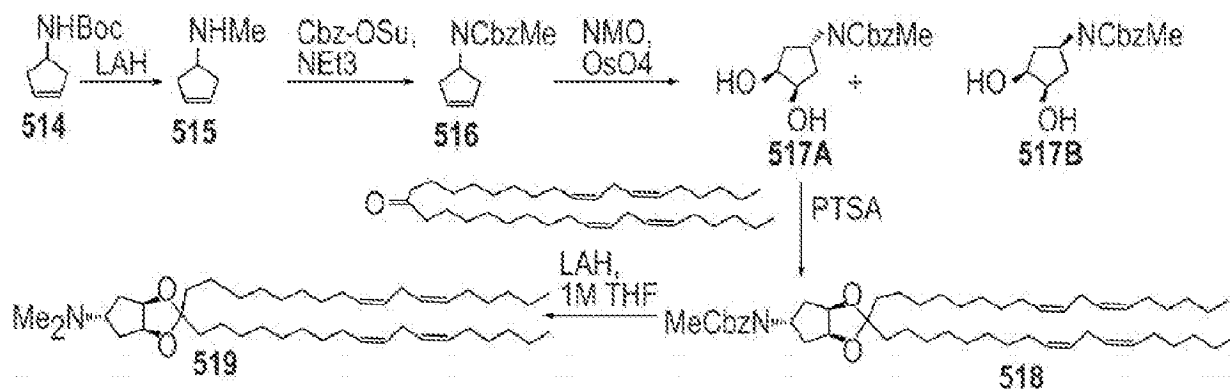
## Схема 2



## Синтез МСЗ

Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6, 9, 28, 31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата) было следующим. Раствор (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6, 9, 28, 31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N,N-диметиламиномасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной хлористоводородной кислотой, за которой следовал разбавленный водный бикарбонат натрия. Органические фракции высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли при помощи роторного вакуумного испарителя. Остаток проходил через колонку с силикагелем (20 г) с использованием градиента элюирования 1-5% метанол/дихлорметан. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и растворитель удаляли с получением бесцветного масла (0,54 г). Синтез ALNY-100

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



### Синтез 515

К перемешиваемой суспензии  $\text{LiAlH}_4$  (3,74 г, 0,09852 моля) в 200 мл безводного THF в двухгорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моля) в 70 мл THF при  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали, и разводили 400 мл диоксана и 26 мл конц.  $\text{HCl}$ , и перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г.  $^1\text{H}$ -ЯМР (ДМСО, 400 МГц):  $\delta=9,34$  (широкий, 2H), 5,68 (с, 2H), 3,74 (м, 1H), 2,66–2,60 (м, 2H), 2,50–2,45 (м, 5H).

### Синтез 516

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двухгорлой RBF добавляли  $\text{NEt}_3$  (37,2 мл, 0,2669 моля) и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонил)-сукцинимид (20 г, 0,08007 моля) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2–3 ч., определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно

раствором 1н. HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (1×50 мл). Органический слой затем высушивали над безводн. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель выпаривали с получением неочищенного материала, который очищали при помощи колоночной хроматографии с силикагелем с получением 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц): δ=7,36-7,27(м, 5H), 5,69 (с, 2H), 5,12 (с, 2H), 4,96 (уш., 1H) 2,74 (с, 3H), 2,60(м, 2H), 2,30-2,25(м, 2H). LC-MS [M+H] -232,3 (96,94%).

#### *Синтез 517A и 517B*

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моля) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одnogорлой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метил-морфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моля), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO<sub>4</sub> (0,275 г, 0,00108 моля) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч.) смесь гасили при помощи добавления твердого Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> (1×50 мл), вода (1×30 мл) и в конце соляной раствор (1×50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель удаляли в вакууме. В результате очистки неочищенного материала при помощи колоночной хроматографии с силикагелем получали смесь диастереоизомеров, которые разделяли при помощи преп. HPLC. Выход: - 6 г неочищенного продукта.

517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMCO, 400 МГц): δ=7,39-7,31(м, 5H), 5,04(с, 2H), 4,78-4,73 (м, 1H), 4,48-4,47 (д, 2H), 3,94-3,93(м, 2H), 2,71(с, 3H), 1,72-1,67 (м, 4H). LC-MS - [M+H]-266,3, [M+NH<sub>4</sub>]-283,5 присутствует, HPLC-97,86%. Стереохимию подтверждали при помощи рентгенограммы.

#### *Синтез 518*

При помощи процедуры, аналогичной описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц): δ=7,35-7,33 (м, 4H), 7,30-7,27 (м, 1H), 5,37-5,27 (м, 8H), 5,12 (с, 2H), 4,75 (м, 1H), 4,58-4,57 (м, 2H), 2,78-2,74 (м, 7H), 2,06-2,00 (м, 8H),

1,96-1,91 (м, 2Н), 1,62 (м, 4Н), 1,48 (м, 2Н), 1,37-1,25 (уш.м, 36Н), 0,87 (м, 6Н). HPLC-98,65%.

*Общая процедура для синтеза соединения 519*

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к охлажденному на льду раствору ЛАН в THF (1 М, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч., затем опять охлаждали на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизовали насыщенным водным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем фильтровали через целит и переводили в масло. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. <sup>13</sup>C ЯМР δ=130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 226, 14,1; Electrospray MS (+ve): Молекулярный вес для C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

Составы, полученные либо при помощи стандартного способа, либо при помощи способа без экструзии, характеризуются одинаковым образом. Например, составы, как правило, характеризуют при помощи визуального осмотра. Это должны быть белесые прозрачные растворы, в которых нет агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц по размеру липидных наночастиц можно измерять при помощи рассеяния света, используя, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Размер частиц должны быть примерно 20-300 нм, например, 40-100 нм. Распределение частиц по размеру должно быть одновершинным. Общую концентрацию dsRNA в составе, а также захваченную фракцию определяют при помощи анализа на исключение красителя. Образец составленной dsRNA можно инкубировать со связывающимся с РНК красителем, например Ribogreen (Molecular Probes), в присутствии или при отсутствии разрушающего состав поверхностно-активного вещества, например, 0,5% Triton-X100. Общую dsRNA в составе можно определять по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, по отношению к калибровочной кривой. Захваченную фракцию определяют путем вычитания содержания "свободной" dsRNA (которое измерено по сигналу при

отсутствии поверхностно-активного вещества) из общего содержания dsRNA. Процент захваченной dsRNA, как правило, составляет >85%. Для состава SNALP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от примерно по меньшей мере 50 нм до примерно по меньшей мере 110 нм, от примерно по меньшей мере 60 нм до примерно по меньшей мере 100 нм или от примерно по меньшей мере 80 нм до примерно по меньшей мере 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или минитаблетки. Необходимыми могут быть загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления пероральные составы являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводятся в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-

монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе распыляемых высушенных частиц, или образуют комплексы с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают поли-аминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(д, L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), подбололочечного, интравентрикулярного или внутripеченочного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут

содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как, без ограничения, вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

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

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

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

### *C. Дополнительные Составы*

*1. Эмульсии*

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой, в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1  $\mu\text{m}$  (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут



представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью либо ее отсутствием. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае подобных эмульсии мазевых основ и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть классифицированы на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные базы и высокодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий и были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.

285; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидролипидным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

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

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий и улучшают свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные сложные эфиры, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в *Pharmaceutical Dosage*

Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

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

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

Применение составов эмульсий посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th

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

#### *ii. Микроэмульсии*

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции иРНК и нуклеиновые кислоты составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая является отдельным оптически изотропным и термодинамически устойчивым жидким раствором (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.)*, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают путем сперва диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в *Controlled*

Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

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

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно

или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образуемого среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, без ограничения, материалы, такие как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C8-C12) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C8-C10глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как o/w, так и w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного увеличения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести мембран и проницаемости, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердой лекарственной формой, улучшенной клинической действенности и пониженной токсичности (см., например, патент

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

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут классифицироваться, как принадлежащие одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие неповерхностно-активные вещества (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов был рассмотрен выше выше.

### *iii. Микрочастицы*

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

### *iv. Вещества, способствующие проникновению*

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении

применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую проходит проникновения, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к обеспечению диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

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

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



43. Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C<sub>1-20</sub>алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и t-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миистат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, выражение "соли желчных кислот" включают любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любое из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (глихолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия),

таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидро-фузидат (STDHF) натрия, гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (ПОЕ) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего абсорбция иРНК через слизистую повышается. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают, без ограничения, динатриевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетоннов (енамины) (см., например, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Применяемые в данном документе нехелатирующие неповерхностно-активные соединения, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию иРНК через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые усиливают поглощение иРНК на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al.*, патент США №5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo *et al.*, заявка РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER

(Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, USA), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

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

#### *v. Носители*

Определенные композиции по настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Применяемые в данном документе выражения "соединение-носитель" или "носитель" могут означать нуклеиновую кислоту или ее аналог, которые являются инертными (*т.е.* не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты с биологической активностью, например, путем разрушения

биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, перерабатываемой печенью, почками или другими внесосудистыми депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, переработка частично фосфотиоатной dsRNA печеночной тканью может быть снижена при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетиамидо-4'-изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфокислотой (Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *et al.*, DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

#### *vi. Наполнители*

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и *т.д.*, при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (*например*, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и *т.д.*); наполнители (*например*, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и *т.д.*); смазывающие вещества (*например*, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металла, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и *т.д.*); разрыхлители (*например*, крахмал, натрия крахмалгликолат и *т.д.*);

и смачивающие средства (*например, лаурилсульфат натрия и т.д.*).

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

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

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

#### *vii. Другие компоненты*

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в данной области. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического составления композиций по настоящему изобретению в различных лекарственных

формах, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако, такие материалы при добавлении не должны чрезмерно вступать в конфликт с биологическими активностями компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы могут быть стерильными и, при необходимости, их можно смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или душистыми веществами и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой (нуклеиновыми) кислотой (кислотами) состава.

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

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (a) одно или несколько соединений, представляющих собой иРНК, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые пригодны в лечении гемолитического нарушения. Примеры таких средств включают, без ограничения, противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза. Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с иРНК, описанными в данном документе. Другие средства, пригодные для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как теллапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патент США №№ 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217, Tung *et al.*, и в публикации заявки на патент США № 2004/0127488, Hale *et al.*.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например,

для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсичным и терапевтическим действием является терапевтическим индексом, и его можно выразить как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

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

В дополнении к их введению, рассматриваемому выше, иРНК, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией С5. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения иРНК, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном



документе.

## VI. Способы Ингибирования Экспрессии C5

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

Приведение клетки в контакт с двухцепочечным средством RNAi можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт со средством RNAi *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток субъекта, например, субъекта-человека, в контакт со средством RNAi. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Приведение в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как рассматривалось выше. Более того, приведение в контакт клетки можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд, представляющий собой GalNAc<sub>3</sub>, или любой другой лиганд, который направляет средство RNAi к месту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

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

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

"Ингибирование экспрессии гена C5" включает любой уровень ингибирования гена C5, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена C5. Экспрессия гена C5 может быть

оценена на основании уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена C5, например, уровня мРНК C5, уровня белка C5 или, например, CH<sub>50</sub> активности, как меры общей гемолитической активности комплемента, AH<sub>50</sub> для измерения гемолитической активности альтернативного пути комплемента и/или уровня лактатдегидрогеназы (LDH), как меры внутрисосудистого гемолиза и/или уровня гемоглобина. Уровни C5a-, C5b- и растворимого C5b-9-комплекса также можно измерять для оценки экспрессии C5. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые связаны с экспрессией C5, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена C5 ингибируется по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере

приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена С5 может служить снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген С5 и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством RNAi по настоящему изобретению или посредством введения средства RNAi по настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена С5 ингибируется по сравнению со второй клеткой или второй группой клеток, по сути, идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(ые) клетка(и)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

$$\frac{(\text{mRNA in control cells}) - (\text{mRNA in treated cells})}{(\text{mRNA in control cells})} \cdot 100\%$$

В альтернативном случае, ингибирование экспрессии гена С5 можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена С5, например, экспрессией белка С5, экспрессией гена или белка гепсидина, или уровнем железа в тканях или сыворотке. Сайленсинг гена С5 можно выявить в любой клетке, экспрессирующей С5, либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области. Печень является основным местом экспрессии С5. Другие важные места экспрессии включают почки и матку.

Доказательством ингибирования экспрессии белка С5 может служить снижение уровня белка С5, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии мРНК,

ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе обработанных клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе контрольных клеток.

Контрольная клетка или группа контрольных клеток, которые можно применять для оценки ингибирования экспрессии гена С5, включают клетку или группу клеток, которые еще не были в контакте со средством RNAi по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа контрольных клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством RNAi.

Уровень мРНК С5, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять при помощи любого способа, известного в данной области, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии С5 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена С5. РНК можно извлекать из клеток при помощи методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз (Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричные анализы.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии С5 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", применяемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим С5. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Могут быть особым образом сконструированы зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, без ограничения, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные мРНК можно использовать при анализах на основе

гибридизации или амплификации, которые включают, без ограничения, анализы, представляющие собой саузерн- или нозерн-блоттинг, анализы, представляющие собой полимеразную цепную реакцию (PCR), и матрицы с зондами. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК С5. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем пропускания выделенной мРНК через агарозный гель и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, на генном микрочипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровней мРНК С5.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии С5 в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК), например, мРНК в образце, например, при помощи RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в Mullis, 1987, патенте США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательностей (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), транскрипционно-опосредованной амплификационной системы (Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, за которым следует обнаружение амплифицированных молекул при помощи методик, хорошо известных специалисту в данной области. Такие схемы обнаружения особенно пригодны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах по настоящему изобретению уровни экспрессии С5 определяют при помощи флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™

System).

Уровни экспрессии мРНК С5 можно контролировать при помощи мембранного блота (как, например, используемого при анализе гибридизации, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанную нуклеиновую кислоту). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ при помощи ссылки. Определение уровня экспрессии С5 также может включать применение зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

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

Уровень экспрессии белка С5 можно определить, применяя любой способ, известный в данной области для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Выражение "образец", применяемое в данном документе, означает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить

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

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство RNAi вводят субъекту так, что средство RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии C5 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня мРНК C5 или белка C5 в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления местом является печень. Местом также может быть подсеция или подгруппа клеток из любого из указанных выше мест. Место также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

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

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем введения инъекцией средства RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем введения инъекцией

средства RNAi в другую область, например, кровотока или подкожное пространство так, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт со средством. Например, средство RNAi может содержать лиганд и/или может быть связано с ним, например, GalNAc3, который направляет средство RNAi к месту, представляющему интерес, например, к печени. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Например, клетку также можно приводить в контакт со средством RNAi *in vitro* и в дальнейшем пересаживать субъекту.

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

#### VII. Способы лечения или Предотвращения Заболевания, Связанного с Компонентом Комплекента C5

Настоящее изобретение обеспечивает также терапевтические и профилактические способы, включающие введение субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплекента C5, например, PNH или aHUS, средства, представляющего собой иРНК, фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, или вектора, содержащего иРНК, по настоящему изобретению. В некоторых аспектах настоящего изобретения способы дополнительно включают введение субъекту



дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS. Способы лечения (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, нацеленного на ген C5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленной на ген C5, тем самым осуществляя лечение субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие.

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

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, например,

dsRNA, или вектора по настоящему изобретению, предотвращая тем самым по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие. Например, настоящее изобретение предлагает способы предотвращения гемолиза субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, например, PNH или aHUS.

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

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

"Профилактически эффективное количество", применяемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства RNAi или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба), которого при введении субъекту, страдающему заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, но еще (или в настоящее время) не испытывавшему или не демонстрирующему симптомы заболевания, и/или который представляет собой объект риска развития заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, например, субъекту, страдающему реакцией отторжения трансплантата и/или после пересадки, например, сенсibilизированное или аллогенное отторжение, субъекту с сепсисом и/или субъекту с инфарктом миокарда, достаточно для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства, представляющего собой иРНК, или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента, пути введения средства, антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства RNAi или антитела к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба), которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства, представляющие собой иРНК, применяемые в способах по настоящему изобретению можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению при лечении субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, например, антитела к компоненту комплемента С5 или его антигенсвязывающего фрагмента (например, экулизумаба) при лечении субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA, по настоящему изобретению, нацеленного на ген С5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на ген С5, при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие, такого как субъект, страдающий заболеванием, при котором снижение экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие, например, заболеванием, связанным с компонентом комплемента С5, например, PNH или aHUS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению средства, представляющего собой иРНК, например, dsRNA, по настоящему изобретению, нацеленного на ген С5, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на ген С5, при производстве лекарственного средства для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как антитело к компоненту комплемента С5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), для лечения субъекта, например, субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии С5 окажет благоприятное воздействие, например, с заболеванием, связанным с компонентом комплемента С5, например, PNH или aHUS.

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

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

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

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

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

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

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

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

Кроме того, дополнительное терапевтическое средство,

например, экулизумаб, можно вводить субъекту в одном составе со средством, представляющим собой иРНК, нацеленным на С5, или в другом составе, как средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на С5.

Схема приема экулизумаба описана, например, в инструкции на продукт экулизумаб (SOLIRIS®) и в заявке на патент США № 2012/0225056, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В иллюстративных способах по настоящему изобретению для лечения заболевания, связанного с компонентом комплемента С5, например, PNH или аНУС, средство, представляющее собой иРНК, нацеленное на С5, сперва вводят (например, подкожно) субъекту таким образом, что уровни С5 у субъекта уменьшаются (например, на по меньшей мере приблизительно 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере приблизительно 99% или более), а затем вводят экулизумаб в дозах, меньших, чем описаны в инструкции на продукт SOLIRIS®. Например, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого. Экулизумаб также можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого. Если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через одну неделю в дозе менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две

недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой приблизительно через одну неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту в раз неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого. Если объекту проводят плазмоферез или замещение плазмы, экулизумаб можно вводить субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 300 мг) или меньше, чем приблизительно 600 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 600 мг или более). Если объекту проводят инфузию плазмы, экулизумаб можно вводить субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 300 мг или более). Более низкие дозы экулизумаба можно вводить либо подкожно, или внутривенно.

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



приблизительно 10 мг/кг, или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. Например, экулизумаб можно вводить субъекту, например, подкожно в дозе 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7 мг/кг, 7,5 мг/кг, в дозе 8 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9 мг/кг, 9,5 мг/кг, 10 мг/кг, 10,5 мг/кг, 11 мг/кг, 11,5 мг/кг, 12 мг/кг, 12,5 мг/кг, 13 мг/кг, 13,5 мг/кг, 14 мг/кг, 14,5 мг/кг или 15 мг/кг.

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

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

Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем определения прогрессирования заболевания, ремиссии, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, подходящего для данного заболевания, подвергаемого лечению или нацеленного на его предотвращение. Вполне в пределах способности специалиста в

данной области техники контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения гемолитического нарушения можно оценить, например, с помощью периодического контроля уровней LDH и  $CH_{50}$ . Сравнение поздних показаний с начальными показаниями обеспечивает врача показаниями, является ли лечение эффективным. Вполне в пределах способности специалиста в данной области техники контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с этим введение иРНК, нацеленной на C5, или ее фармацевтической композиции "эффективной против" заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, показывает, что введение клинически соответствующим способом приводит к благотворному воздействию на по меньшей мере статистически значимую часть пациентов, такому как улучшению симптомов, лечению, снижению заболеваний, продлению жизни, улучшению качества жизни или другому эффекту, как правило признанному положительным врачами, знакомыми с лечением заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, и связанных причин.

Эффект лечения или предупредительное действие очевидны, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких показателей болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера, благоприятное изменение измеряемого показателя заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может служить признаком эффективного лечения. Об эффективности данного лекарственного препарата iRNA или состава этого лекарственного препарата можно также судить при помощи экспериментальной животной модели для данного заболевания, которая известна в данной области. При использовании экспериментальной животной модели, эффективность лечения доказана, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

Кроме того, эффективность может быть оценена при уменьшении

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

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

мг/кг dsRNA, 9,4 мг/кг dsRNA, 9,5 мг/кг dsRNA, 9,6 мг/кг dsRNA, 9,7 мг/кг dsRNA, 9,8 мг/кг dsRNA, 9,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 10 мг/кг dsRNA, 15 мг/кг dsRNA, 20 мг/кг dsRNA, 25 мг/кг dsRNA, 30 мг/кг dsRNA, 35 мг/кг dsRNA, 40 мг/кг dsRNA, 45 мг/кг dsRNA или приблизительно 50 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда композиция по настоящему изобретению включает dsRNA, как описано в данном документе, и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, например, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до

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

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

В других вариантах осуществления, например, когда композиция  
по настоящему изобретению содержит dsRNA, как описано в данном  
документе, и N-ацетилгалактозамин, субъекту можно вводить  
терапевтическое количество иРНК, например, в дозе от  
приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно  
0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до  
приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до  
приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно  
50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от  
приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно





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

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, например, приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

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



первичного режима обработки обработки можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

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

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

Благодаря ингибирующему действию на экспрессию С5, композиция по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, приготовленная из нее, может повысить качество жизни.

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

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

липосомной dsRNA.

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

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

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

Кроме того, изобретение относится к способам и применению средства, представляющего собой иРНК, или его фармацевтической композиции (включая способы и применение средства, представляющего собой иРНК, или фармацевтической композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, и антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент) для лечения субъекта, у которого снижение и/или ингибирование экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, у субъекта, страдающего заболеванием, связанным с компонентом

комплемента C5, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими способами, например, известными фармацевтическими и/или терапевтическими способами, такие как, например, те, которые в настоящее время применяют при лечении этих нарушений. Например, в некоторых вариантах осуществления иРНК, нацеленную на C5, вводят в комбинации с, например, средством, пригодным при лечении заболевания, связанного с компонентом комплемента C5, как описано в других частях данного документа.

Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, пригодные для лечения субъекта, у которого снижение экспрессии C5 окажет благоприятное воздействие, например, субъекта, страдающего заболеванием, связанным с компонентом комплемента C5, включают плазмаферез, тромболитическую терапию (например, с применением стрептокиназы), антиагреганты, фолиевую кислоту, кортикостероиды; иммунодепрессанты; эстрогены, метотрексат, 6-MP, азатиоприн, сульфасалазин, месалазин, олсалазин, хлорохин/гидроксихлорохин, пеницилламин, ауротиомалат (внутримышечно и перорально), азатиоприн, колхицин, кортикостероиды (пероральные, ингаляционные и местные инъекции), бета-2 агонисты адренорецепторов (сальбутамол, тербуталин, салметерол), ксантины (теофиллин, аминофиллин), кромогликат, недокромил, кетотифен, ипратропий и окситропий, циклоспорин, FK-506, рапамицин, микофенолятмофетил, лефлуномид, NSAID, например, ибупрофен, кортикостероиды, такие как преднизолон, ингибиторы фосфодиэстеразы, агонисты, аденозина, антитромботические средства, ингибиторы комплемента, адренергические средства, средства, препятствующие сигнальной функции провоспалительных цитокинов, такие как TNF- $\alpha$  или IL-1 (например, ингибиторы киназы IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP), ингибиторы фермента IL-1 $\beta$ -преобразования, ингибиторы фермента TNF $\alpha$ -преобразования (TACE), ингибиторы сигнальных T-клеток, таких как ингибиторы киназы, ингибиторы металлопротеиназ, сульфасалазин, азатиоприн, 6-меркантопурины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента,

рецепторы растворимых цитокинов и их производные (например, растворимые p55 или p75 TNF-рецепторы и производные p75TNFRlgG (Enbrel™ и p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII и sIL-6R), противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGFβ), целекоксиб, фолиевая кислота, гидроксихлорохин сульфат, рофекоксиб, этанерцепт, моноклональное антитело инфликсима, напроксен, валдекоксиб, сульфасалазин, метилпреднизолон, мелоксикам, метилпреднизолон ацетат, золото, тиомалат натрия, аспирин, триамцинолона ацетонид, пропексифена напсилат/апап, фолат, набуметон, диклофенак, пироксикам, этодолак, диклофенак натрия, оксапрозин, оксикодона гидрохлорид, гидрокодона битартрат/апап, диклофенак натрия/мизопростол, фентанил, анакинра, рекомбинантный иммуноглобулин человека, трамадола гидрохлорид, салсалат, сулиндак, цианокобаламин/fa/пиридоксин, ацетаминофен, алендронат натрия, преднизолон, сульфат морфина, лидокаина гидрохлорид, индометацин, глюкозамин сульфат/хондроитин, амитриптилина гидрохлорид, сульфадиазин, оксикодона гидрохлорид/ацетаминофен, олопатадина гидрохлорид, мизопростол, напроксен натрия, омепразол, циклофосамид, моноклональное антитело ритуксима, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, антитело к IL-18, антитело к IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, рофлумиласт, IC-485, CDC-801, мезопрам, циклоспорин, цитокин-супрессивный противовоспалительный лекарственный препарат(ы) (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (гуманизированное антитело к TNFα; Celltech/Bayer); cA2/моноклональное антитело инфликсима (химерное антитело к TNFα; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/этанерцепт (75 кДа рецептор TNF-IgG слитый белок; Immunex, см., например, (1994) Arthr. Rheum. 37: S295; (1996) J. Invest. Med. 44: 235A); 55 кД TNF-IgG (55 кД рецептор TNF-IgG слитый белок Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (не осуществляющее деплецию приматизированное антитело к CD4; IDEC/SmithKline; см., например, (1995) Arthr. Rheum. 38: S185); DAB 486-IL-2 и/или DAB 389-IL-2 (IL-2 слитые белки; Seragen; см., например, (1993) Arthrit. Rheum. 36: 1223); антитело к Tac (гуманизированное

антитело к IL-2R $\alpha$ ; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (противовоспалительный цитокин; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; рекомбинантный IL-10, противовоспалительный цитокин; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 и/или IL-4 агонисты (например, антитела агонистов); IL-1RA (антагонист IL-1-рецептора; Synergen/Amgen); анакинра (Kineret<sup>®</sup>/Amgen); TNF-bp/s-TNF (растворимый TNF-связывающий белок; см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S284; (1995) Amer. J. Physiol. - Heart and Circ. Physiol. 268: 37-42); R973401 (ингибитор фосфодиэстеразы тип IV; см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S282); МК-966 (COX-2-ингибитор; см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S81); илопрост (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S82); метотрексат; талидомид (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S282) и талидомид-связанные лекарственные препараты (например, Celgen); лефлуномид (противовоспалительный и ингибитор цитокина, см. например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S131; (1996) Inflamm. Res. 45: 103-107); транексамовая кислота (ингибитор активации плазминогена, см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S284); Т-614 (ингибитор цитокина; см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S282); простагландин E1 (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S282); тенидап (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат; см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S280); напроксен (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат; см., например, (1996) Neuro. Report 7: 1209-1213); мелоксикам (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); ибупрофен (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); пироксикам (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); диклофенак (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); индометацин (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); сульфасалазин (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement)): S281); азатиоприн (см., например, (1996) Arthr.

Rheum. 39(9 (supplement): S281); ингибитор ICE (ингибитор интерлейкин-1 $\alpha$  превращающего фермента); ингибитор zap-70 и/или lck (ингибитор тирозинкиназы zap-70 или lck); ингибитор VEGF и/или ингибитор VEGF-R (ингибиторы фактора роста клеток эндотелия сосудов или рецептор фактора роста клеток эндотелия сосудов; ингибиторы ангиогенеза); кортикостероидные противовоспалительные лекарственные средства (например, SB203580); ингибиторы конвертазы TNF; антитела к IL-12; антитела к IL-18; интерлейкин-11 (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement): S296); интерлейкин-13 (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement): S308); ингибиторы интерлейкин-17 (см., например, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (supplement): S120); золото; пеницилламин; хлорохин; хлорамбуцил; гидроксихлорохин; циклоспорин; циклофосфамид; общее облучение лимфоидной ткани; антитело-глобулин к Т-клеткам; антитела к CD4; CD5-токсины; перорально вводимые пептиды и коллаген; динатрий лобензарит; средства, регулирующие цитокины (CRA) HP228 и HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1-антисмысловые фосфотиоатные олигодезоксинуклеотиды (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор комплемента 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); преднизолон; оротеин; гликозаминогликан полисульфат; миноциклин; антитела к IL2R, липиды морского и ботанического происхождения (жирные кислоты рыбы и семян растений, см., например, DeLuca *et al.* (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21: 759-777); ауранофин; фенилбутазон; меклофенамовая кислота; флуфенамовая кислота; иммуноглобулин для внутривенного введения; zileuton; азарибин; микофенолоксилат (RS-61443); такролимус (FK-506); сиролимус (рапамацин); амприлоз (терафектин); кладрибин (2-хлордезоксаденозин); метотрексат; ингибиторы bcl-2 (см. Bruncko, M. *et al.* (2007) J. Med. Chem. 50(4): 641-662); противовирусные и иммуномодулирующие средства, малую молекулу ингибитора KDR, малую молекулу ингибитора Tie-2; метотрексат; преднизолон; цефекоксиб; фолиевую кислоту; гидроксихлорохин сульфат; рофекоксиб; этанерсепт; моноклональное антитело

инфликс; лефлуномид; напроксен; валдекоксиб; сульфасалазин; метилпреднизолон; ибупрофен; мелоксикам; ацетат метилпреднизолон; золото тиомалат натрия; аспирин; азатиоприн; триамцинолона ацетонид; пропксифена напсилат/апап; фолат; набуметон; диклофенак; пироксикам; этодолак; диклофенак натрия; оксапрозин; оксикодона гидрохлорид; гидрокодона битартрат/апап; диклофенак натрия/мизопростол; фентанил; анакинра, рекомбинантный глобулин человека; трамадола гидрохлорид; салсалат; сулиндак; цианокобаламин/fa/пиридоксин; ацетаминофен; алендронат натрия; преднизолон; сульфат морфина; лидокаина гидрохлорид; индометацин; глюкозамина сульфат/хондроитин; циклоспорин; амитриптилина гидрохлорид; сульфадиазином; оксикодон гидрохлорид/ацетаминофен; олопатадина гидрохлорид; мизопростол; напроксен натрия; омепразол; микофенолятмофетил; циклофосфамид; моноклональное антитело ритукси; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; антитело к IL 18; антитело к IL 15; VIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; рофлумиласт; IC-485; CDC-801; мезопрам, альбутерол, сальметерол/флутиказон, монтелукаст натрия, пропионат флутиказона, будесонид, преднизон, ксинафоат салметерола, левалбутерол гидрохлорид, альбутерола сульфат/ипратропиум, натрия фосфат преднизолон, триамцинолона ацетонид, беклометазон дипропионат, ипратропия бромид, азитромицин, пирбутерола ацетат, преднизолон, теофиллин безводный, натрия сукцинат метилпреднизолон, кларитромицин, зафирлукаст, формотерола фумарат, вакцина против вируса гриппа, метилпреднизолон, амоксициллина тригидрат, флунизолид, инъекции против аллергии, кромолин натрия, фексофенадина гидрохлорид, флунизолид/ментол, амоксициллин/клавуланат, левофлоксацин, вспомогательное устройство для ингаляций, гуафенизин, дексаметазона натрия фосфат, моксифлоксацина гидрохлорид, доксициклина гиклат, гуаифенезин/d-меторфан, р-эфедрин/кодеин/хлорфенир, гатифлоксацин, цетиризина гидрохлорид, мометазона фураат, сальметерола ксинафоат, бензонатат, цефалексин, фенилэфрин/гидрокодон/хлорфенирамин, цетиризина гидрохлорид/псевдоэфедрин, фенилэфрин/кодеин/прометазин, кодеин/прометазин, цефпрозил, дексаметазон,



гуаифенезин/псевдоэфедрин, хлорфенирамин/гидрокодон, недокромил натрия, тербуталина сульфат, эпинефрин, метилпреднизолон, метапротеренола сульфат, аспирин, нитроглицерин, метопролола тартрат, эноксапарин натрия, гепарин натрия, клопидогреля бисульфат, карведилол, атенолол, морфина сульфат, метопролола сукцинат, варфарин натрия, лизиноприл, изосорбида мононитрат, дигоксин, квинаприла гидрохлорид/mag carb, буметанид, альтеплаза, эналаприлат, амиодарона гидрохлорид, тирофибана гидрохлорид м-гидрат, дилтиазема гидрохлорид, каптоприл, ирбесартан, валсартана, пропранолола гидрохлорид фурсемид, симвастатин, рамиприл, тенектеплаза, эналаприла малеат, торсемид, ретаваз, лозартан калия, фозиноприл натрия, лидокаина гидрохлорид, эптифибатид, цефазолин натрия, атропина сульфат, аминокaproновую кислоту, спиронолактон, интерферон, соталола гидрохлорид, хлорид калия, докузат натрия, добутамина гидрохлорид, алпразолам, правастатин натрий, аторвастатин кальция, мидазолама гидрохлорид, гидроморфона гидрохлорид, изосорбида динитрат, адреналин, дофамина гидрохлорид, бивалирудин, розувастатин, эзетимиб/симвастатин, авасимиб и карипорид.

Средство, представляющее собой иРНК (и/или антитело к компоненту комплемента С5) и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельного состава, или в разное время, и/или другим способом, известным в данной области техники или описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к способам применения средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство, представляющее собой иРНК, по настоящему изобретению для уменьшения и/или ингибировать экспрессии компонента комплемента С5 в клетке. В других аспектах настоящее изобретение относится к иРНК по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей иРНК по настоящему изобретению, для применения при уменьшении и/или ингибировании экспрессии компонента комплемента С5 в клетке. В

других аспектах предусматривается применение иРНК по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей иРНК по настоящему изобретению при производстве лекарственного средства для уменьшения и/или ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке.

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

Уменьшение экспрессии гена можно оценить любым из способов, известных в данной области. Например, снижение экспрессии C5 можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК C5 с применением обычных способов, известных обычному специалисту в данной области, например, Нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка C5 с применением обычных способов, известных обычному специалисту в данной области, таких как Вестерн-блоттинг, иммунологические методы, способ проточной цитометрии, ELISA, и/или путем определения биологической активности C5, как при реакции гемолиза CH<sub>50</sub> или AH<sub>50</sub>, и/или путем определения биологической активности одной или нескольких молекул, связанных с системой комплемента, например, продуктами C5, такими как C5a и C5b (или *in vivo* условиях, например, в условиях гемолиза).

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

Клеткой, пригодной для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, экспрессирующая ген C5. Клеткой, пригодной для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (например, клетка человека или клетка

примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетка отличного от примата (например, клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кошки, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетка птицы (например, клетка утки или клетка гуся), или клетка кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека.

Экспрессию С5 можно ингибировать в клетке на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100%.

Способы и варианты применения *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере части РНК-транскрипта гена С5 млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающего, такого как человек, композицию можно вводить любыми способами, известными в данной области техники, включая без ограничения подкожное, внутривенное, оральное, внутрибрюшинное или парентеральное введение, включая внутричерепное (например, внутрижелудочковое, интрапаренхимальное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят в виде подкожных или внутривенных инфузий или инъекций.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют

посредством инъекции вещества замедленного всасывания. Инъекция вещества замедленного всасывания может высвобождать иРНК устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, при помощи инъекции вещества замедленного всасывания можно снижать частоту введения доз, необходимых для получения необходимого действия, например, необходимого ингибирования С5, или терапевтического или профилактического действия. Инъекция вещества замедленного всасывания может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыворотке. Инъекции вещества замедленного всасывания могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция вещества замедленного всасывания является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. В определенных вариантах осуществления насос является подкожно имплантированным осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является имплантируемым хирургическим путем насосом, который доставляет иРНК в печень.

Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо местное или системное лечение, и исходя из области, которая подлежит лечению. Путь и место введения можно выбрать для увеличения нацеленного воздействия.

В одном аспекте настоящее также изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии гена С5 у человека. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей иРНК, например, dsRNA, нацеленной на ген С5 в клетке млекопитающего для применения в ингибировании экспрессии гена С5 у млекопитающего. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению иРНК, например, dsRNA, нацеленной на ген С5 в клетке млекопитающего, при производстве лекарственного средства

для ингибирования экспрессии гена C5 у млекопитающего.

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

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

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

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

#### ПРИМЕРЫ

##### Пример 1. Синтез иРНК

###### *Происхождение реагентов*

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

###### *Транскрипты*

Осуществляли конструирование siRNA для идентификации siRNA, нацеленной на транскрипты C5 человека, макак резус (*Macaca mulatta*), мыши, крысы, отмеченных в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции RefSeq NCBI: Человека - NM\_001735.2; Макак резус - XM\_001095750.2; Мыши - NM\_010406.2; Крысы - XM\_345342.4. Дуплексы SiRNA конструировали в нескольких отдельных партиях, включая без ограничения партии, содержащие дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и макак резус; только транскриптам человека, макак резус и мыши; только транскриптам человека, макак резус, мыши и крысы; и только транскриптам мыши и крысы. Все дуплексы siRNA конструировали с получением 100% идентичности с указанным транскриптом человека и транскриптов других видов, рассмотренных в каждой партии конструкции (выше).

###### *Конструирование siRNA, Специфичность и Прогноз эффективности*

Прогнозируемую специфичность всех возможных 19mers предсказывали из каждой последовательности. Затем отбирали 19mers кандидаты, не имеющих повторы более, чем 7 нуклеотидов. Эти 2971 кандидата человек/макак резус, 142 человек/макак резус/мышь, 54 человек/макак резус/мышь/крыса и 807 мышь/крыса применяли в

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

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

Обе цепи siRNA назначали к категории спецификации в соответствии с расчетными баллами: оценка выше 3 квалифицируется как весьма специфическая, при значении 3 как специфическая, и между 2,2 и 2,8 как умеренно специфическая. Дуплексы сортировали

по специфике антисмысловой цепи и отбирали те дуплексы, чьи антисмысловые олигонуклеотиды не содержали GC в первом положении, не содержали G в обоих положениях 13 и 14, и содержали 3 или больше U или A в исходном участке.

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

#### *Выбор последовательности siRNA*

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

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

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

#### *Синтез siRNA*

##### Общие Способы Синтеза РНК малого и среднего размера

РНК-олигонуклеотиды синтезировали в масштабах между 0,2-500



□мол с применением коммерчески доступных 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-O-t-бутилдиметилсилил-3'-O-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил)фосфорамидит-мономеров уридина, 4-N-ацетилцитидин, 6-N-бензоиладенозина и 2-N-изобутиргуанозина и соответствующих 2'-O-метил и 2'-фтор фосфорамидитов, согласно стандартным протоколам синтеза олигонуклеотидов в твердой фазе. Растворы амидита готовили в концентрации 0,1-0,15 М и применяли 5-этилтио-1Н-тетразол (0,25-0,6 М в ацетонитриле) в качестве активатора. В процессе синтеза вводили фосфотиоатные модификации остова с применением 0,2 М фенилацетил дисульфида (PADS) в лутидин: ацетонитрил (1:1) (об;об) или 0,1 М 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5 тиона (DDTT) в пиридине для стадии окисления. После завершения синтеза последовательности отщепляли от твердой подложки и снимали защиту с применением метиламина с последующим триметиламином 3НГ для удаления присутствующих 2'-O-t-бутилдиметилсилил-защитных групп.

Для масштабов синтеза между последовательностей (5-500  $\mu$ моль и полностью 2'-модифицированных 2'-фтор и/или 2'-O-метил или их комбинации), у олигонуклеотидов удаляли защитную группу с применением 3:1 (об/об) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака либо при 35°C 16 ч, или при 55°C в течение 5,5 ч. Перед удалением защитной группы аммиака олигонуклеотиды обрабатывали 0,5 М пиперидином в ацетонитриле в течение 20 мин на твердой подложке. Неочищенные олигонуклеотиды анализировали с помощью LC-MS и анионообменной HPLC (IEX-HPLC). Очистку олигонуклеотидов проводили с помощью IEX HPLC в применении: 20 мМ фосфата, 10%-15% ACN, pH=8,5 (буфер А) и 20 мМ фосфата, 10%-15% ACN, 1 М NaBr, pH=8,5 (буфер В). Фракции анализировали на чистоту с помощью аналитической HPLC. Содержащие продукт фракции с приемлемой чистотой объединяли и концентрировали на роторном испарителе до обессоливания. Образцы обессоливали с помощью эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Равные молярные количества смысловых и антисмысловых цепей отжигали в 1х PBS-буфере с получением

соответствующих дуплексов siRNA.

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

#### Синтез GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов для анализа *In Vivo*

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

Для синтеза конъюгатов GalNAc в масштабах между 5-500  $\mu$ мол, указанный протокол синтеза РНК дополняли следующими модификациями: Для подложек синтеза на основе полистирола

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

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

#### Пример 2. Скрининг *in vitro*

##### *Клеточная культура и трансфекции*

Клетки Нер3В (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной поддерживающей среде Игла (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Клетки промывали и ресуспендировали до 0,25×10<sup>6</sup> клеток/мл. Во время трансфекций клетки высевали на 96-луночный планшет с приблизительно 20000 клеток на лунку.

Первичные гепатоциты мыши (PMH) выделяли непосредственно

перед процедурой из самок мышей линии C57BL/6 (Charles River Laboratories International, Inc. Willmington, MA), меньше чем за 1 час до трансфекций, и выращивали в среде первичных гепатоцитов. Клетки ресуспендировали до  $0,11 \times 10^6$  клеток/мл в среде InVitroGRO CP Rat (покрытие) (Celsis In Vitro Technologies, номер по каталогу S01494). Во время трансфекции клетки высевали на 96-луночный коллагеновый планшет BD Bioscoat (BD, 356407), 10000 клеток на лунку, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Криоконсервированные первичные гепатоциты яванского макака (Celsis B Vitro Technologies, M003055-P) оттаивали при 37°C на водяной бане непосредственно перед применением и ресуспендировали до  $0,26 \times 10^6$  клеток/мл в среде InVitroGRO CP (покрытие) (Celsis B Vitro Technologies, номер по каталогу Z99029). Во время трансфекции клетки высевали на 96-луночный коллагеновый планшет BD Bioscoat (BD, 356407), 25000 клеток на лунку, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

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

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

конечной концентрации дуплекса для клеток НерЗВ.

*Трансфекция посредством свободного поглощения*

Эксперименты свободного поглощения проводили путем добавления 10µл дуплексов siRNA в PBS на лунку в 96-луночный планшет. Девяносто µл полной среды роста, содержащей соответствующее количество клеток для типа клеток, затем добавляли к siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 500нМ и 5нМ и эксперименты в отношении эффекта дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 1000, 333, 111, 37, 12,3, 4,12, 1,37, 0,46 нМ.

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

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

*Синтез кДНК с использованием набора "ABI High capacity cDNA*

*reverse transcription kit"* (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

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

#### *PCR в режиме реального времени*

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 2 мкл H<sub>2</sub>O, 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Life Technologies, номер по каталогу 4326317E для клеток Hep3В, номер по каталогу 352339E для первичных гепатоцитов мыши или обычного зонда для первичных гепатоцитов макаков-крабоеда), 0,5 мкл зонда TaqMan для C5 (Life Technologies, номер по каталогу Hs00156197\_m1 для Hep3В клеток или mm00439275\_m1 для первичных гепатоцитов мыши или обычного зонда для первичных гепатоцитов яванского макака) и 5 мкл зонда мастер-микс LightCycler 480 (Roche, номер по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, номер по каталогу 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением  $\Delta\Delta$ Ct (RQ)-анализа. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс испытывали с двумя биологическими повторами, если не указано иное, и каждый раз PCR в режиме реального времени проводили в одинаковых технических повторах. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс испытывали в одном или нескольких экспериментах (3 мыши на группу) и каждый раз PCR в режиме реального времени проводили в одинаковых технических повторах.

Для вычисления относительного кратного изменения в уровнях мРНК C5, данные в реальном времени анализировали с применением  $\Delta\Delta$ Ct-способа и нормализовали в соответствии с данными анализов, выполненных с клетками, трансфицированными 10нМ AD-1955, или

имитационными трансфицированными клетками.  $IC_{50}$  вычисляли с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с таковыми для клеток, трансфицированных AD-1955 в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

СМЫСЛОВАЯ: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 13);

АНТИСМЫСЛОВАЯ: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 14).

Таблица 7 показывает результаты теста разовой дозы в клетках Нер3В, трансфицированных указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

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

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

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

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

Таблица 12 показывает зависимость доза-ответ в тесте свободного поглощения в первичных гепатоцитах мыши указанными

GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Указанные значения  $IC_{50}$  представляют значения  $IC_{50}$  относительно необработанных клеток.

Таблица 13 показывает результаты теста разовой дозы в клетках Нер3В, трансфицированных указанными модифицированными и немодифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам. Доза 0,01нМ представляла собой разовую биологическую трансфекцию и доза 1 нМ представляла собой повторную биологическую трансфекцию.

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

Таблица 15 показывает зависимость доза-ответ в клетках Нер3В, трансфицированных указанными модифицированными и немодифицированными иРНК. Указанные значения  $IC_{50}$  представляют значения  $IC_{50}$  относительно необработанных клеток.

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

Таблица 2

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

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



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

Последовательности Немодифицированной Смысловой и Антисмысловой Цепи dsRNA C5

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

<sup>1</sup>Название вида олигонуклеотида отражает запись GenBank (например, NM\_001735.2) и положение в нуклеотидной последовательности записи GenBank (например, 1517-1539), на которую нацелена антисмысловая цепь.

<sup>2</sup>Число, следующее после десятичной точки, относится к номеру партии.

<sup>3</sup>NM = немодифицированный

AD-58117.1 UM	A-118318.1	UCCUCUGGAAAU UGGCCUUCA	19	A-118319.1	UGAAGGCCAAUUUC CAGAGGAAG	70	NM_001735.2_273 5-2757_as
AD-58123.1 UM	A-118320.1	AAGCAAGAUUUU UUUAUAAUA	20	A-118321.1	UAUUUAUUUUUU CUUGCUIUUU	71	NM_001735.2_784 -806_as
AD-58129.1 UM	A-118322.1	AAAAUGUUUUUG UCAAGUACA	21	A-118323.1	UGUACUUGACAAAA ACAUIIUUCU	72	NM_001735.2_474 4-4766_as
AD-58088.1 UM	A-118324.1	AUUUAAACAACA AGUACCUUU	22	A-118325.1	AAAGGUACUUGUUG UUUAAAUCU	73	NM_001735.2_982 -1004_as
AD-58094.1 UM	A-118326.1	AUUCAGAAAGUC UGUGAAGGA	23	A-118327.1	UCCUUCACAGACUU UCUGAAUUU	74	NM_001735.2_457 8-4600_as
AD-58100.1 UM	A-118328.1	ACACUGAAGCAU UUGAUGCAA	24	A-118329.1	UUGCAUCAAUGCU UCAGUGUUAU	75	NM_001735.2_169 -191_as
AD-58106.1 UM	A-118330.1	GCAGUUCUGUGU UAAAAUGUC	25	A-118331.1	GACAUUUUAACACA GAACUGCAU	76	NM_001735.2_259 1-2613_as
AD-58112.1 UM	A-118332.1	AGGAUUUUGAGU GUAAAAGGA	26	A-118333.1	UCCUUUUACACUCA AAAUCCUUU	77	NM_001735.2_295 5-2977_as
AD-58118.1 UM	A-118334.1	AAUGAUGAACCU UGUAAAGAA	27	A-118335.1	UUCUUUACAAGGUU CAUCAUUUU	78	NM_001735.2_202 5-2047_as
AD-58124.1 UM	A-118336.1	AUCAUUGGAACA UUUUUCAUU	28	A-118337.1	AAUGAAAAAUGUUC CAAUGAUUU	79	NM_001735.2_311 8-3140_as
AD-58130.1 UM	A-118338.1	AGCCAGAAAUUC GGAGUUUAUU	29	A-118339.1	AAUAACUCCGAAUU UCUGGCUUG	80	NM_001735.2_231 7-2339_as

AD-58089.1 UM	A-118340.1	UCCUGGGAGAU AAAACUCAC	30	A-118341.1	GUGAGUUUUUAUCUC CCAGGGAAA	81	NM_001735.2_361 8-3640_as
AD-58095.1 UM	A-118342.1	GAAAAUGAUGAA CCUUGUAAA	31	A-118343.1	UUUACAAGGUUCAU CAUUUUCUU	82	NM_001735.2_202 2-2044_as
AD-58101.1 UM	A-118344.1	AUUGCUC AAGUC ACAUUUGAU	32	A-118345.1	AUCAAUGUGACUU GAGCAAUUC	83	NM_001735.2_918 -940_as
AD-58107.1 UM	A-118346.1	GAGAUUGCAUUAU GCUUAUAAA	33	A-118347.1	UUUAUAAGCAUAUG CAAUCUCUG	84	NM_001735.2_469 8-4720_as
AD-58113.1 UM	A-118348.1	GUUAUCCUGAUA AAAAUUUA	34	A-118349.1	UAAAUUUUUUAUCA GGUAUACUU	85	NM_001735.2_205 -227_as
AD-58119.1 UM	A-118350.1	AGGAAGUUUGCA GCUUUUAUU	35	A-118351.1	AAUAAAAGCUGCAA ACUUCCUCA	86	NM_001735.2_414 7-4169_as
AD-58125.1 UM	A-118352.1	GAAGAAUUGAU CAUAUUGGA	36	A-118353.1	UCCAAUAUGAUCAA UUUCUUCUA	87	NM_001735.2_555 -577_as
AD-58131.1 UM	A-118354.1	AUCCUGAUAAAA AAUUUAGUU	37	A-118355.1	AACUAAAUUUUUA UCAGGAUAA	88	NM_001735.2_208 -230_as
AD-58090.1 UM	A-118356.1	UGGAAAAGAAAU CUUAGUAAA	38	A-118357.1	UUUACUAAGAUUUC UUUCCAAA	89	NM_001735.2_278 6-2808_as
AD-58096.1 UM	A-118358.1	UCUUAUCAAGU AUAAACAUU	39	A-118359.1	AAUGUUUAUACUUU GAUAAGAUG	90	NM_001735.2_159 6-1618_as
AD-58102.1 UM	A-118360.1	UCCCUACAAACU GAAUUUGGU	40	A-118361.1	ACCAAUUCAGUUU GUAGGGAGA	91	NM_001735.2_108 2-1104_as

AD-58108.1 UM	A-118362.1	CAGGAGCAAACA UAUGUCAUU	41	A-118363.1	AAUGACAUAUGUUU GCUCCUGUC	92	NM_001735.2_87- 109_as
AD-58114.1 UM	A-118364.1	ACAUGUAACAAC UGUAGUUCA	42	A-118365.1	UGAACUACAGUUGU UACAUGUAC	93	NM_001735.2_410 9-4131_as
AD-58120.1 UM	A-118366.1	CAGGAAAUCAUU GGAACAUUU	43	A-118367.1	AAAUGUCCAAUGA UUUCCUGUU	94	NM_001735.2_311 2-3134_as
AD-58126.1 UM	A-118368.1	UUUAAGAAUUUU GAAAUUACU	44	A-118369.1	AGUAAUUUCAAAAU UCUUAAAGU	95	NM_001735.2_759 -781_as
AD-58132.1 UM	A-118370.1	UAUUCUGCAACU GAAUUCGAU	45	A-118371.1	AUCGAAUUCAGUUG CAGAAUAC	96	NM_001735.2_441 2-4434_as
AD-58091.1 UM	A-118372.1	GCCCUUGGAAAG AGUAUUUCA	46	A-118373.1	UGAAAUACUCUUUC CAAGGGCUU	97	NM_001735.2_188 6-1908_as
AD-58097.1 UM	A-118374.1	CCUGAUAAAAAA UUUAGUUAC	47	A-118375.1	GUAACUAAAUUUUU UAUCAGGAU	98	NM_001735.2_210 -232_as
AD-58103.1 UM	A-118376.1	CCCUUGGAAAGA GUAUUUCA	48	A-118377.1	UUGAAAUACUCUUU CCAAGGGCU	99	NM_001735.2_188 7-1909_as
AD-58121.1 UM	A-118382.1	UGCAGAUCAAAC ACAAUUUCA	49	A-118383.1	UGAAAUUGUGUUUG AUCUGCAGA	100	NM_010406.2_494 3-4965_as
AD-58133.1 UM	A-118386.1	CAGAUCAAACAC AAUUUCAGU	50	A-118387.1	ACUGAAAUUGUGUU UGAUCUGCA	101	NM_010406.2_494 5-4967_as
AD-58116.1 UM	A-118396.1	GUUCCGGAUAAU UGAACUUUU	51	A-118397.1	AAAAGUUCAAAUAU CCGGAACCG	102	NM_010406.2_450 0-4522_as

AD-58644.1 UM	A-119328.1	AUUUAAACAACA AGUACCUUU	52	A-119329.1	AAAGGUACUUGUUG UUUAAAUCU	103	NM_001735.2_982 -1004_as
AD-58651.1 UM	A-119328.2	AUUUAAACAACA AGUACCUUU	53	A-119339.1	AAAGGUACUUGUUG UUUAAAUCU	104	NM_001735.2_982 -1004_as
AD-58641.1 UM	A-119322.1	UGACAAAUAAC UCACUAUAA	54	A-119323.1	UUAUAGUGAGUUAU UUUGUCAAU	105	NM_001735.2_151 1-1533_as
AD-58648.1 UM	A-119322.2	UGACAAAUAAC UCACUAUAA	55	A-119336.1	UUAUAGUGAGUUAU UUUGUCAAU	106	NM_001735.2_151 1-1533_as
AD-58642.1 UM	A-119324.1	GACAAAUAACU CACUAUAAU	56	A-119325.1	AUUAUAGUGAGUUA UUUUGUCA	107	NM_001735.2_151 2-1534_as
AD-58649.1 UM	A-119324.2	GACAAAUAACU CACUAUAAU	57	A-119337.1	AUUAUAGUGAGUUA UUUUGUCA	108	NM_001735.2_151 2-1534_as
AD-58647.1 UM	A-119334.1	GUUCCGGAUAAU UGAACUUUU	58	A-119335.1	AAAAGUUCAAAUAU CCGGAACCG	109	NM_010406.2_450 0-4522_as
AD-58654.1 UM	A-119334.2	GUUCCGGAUAAU UGAACUUUU	59	A-119342.1	AAAAGUUCAAAUAU CCGGAACCG	110	NM_010406.2_450 0-4522_as
AD-58645.1 UM	A-119330.1	UGCAGAUCAAAC ACAAUUUCA	60	A-119331.1	UGAAAUUGUGUUUG AUCUGCAGA	111	NM_010406.2_494 3-4965_as
AD-58652.1 UM	A-119330.2	UGCAGAUCAAAC ACAAUUUCA	61	A-119340.1	UGAAAUUGUGUUUG AUCUGCAGA	112	NM_010406.2_494 3-4965_as
AD-58643.1 UM	A-119326.1	AAGCAAGAUAAU UUUAUAAUA	62	A-119327.1	UAUUUAAAAAUAU CUUGCUIUUU	113	NM_001735.2_784 -806_as

AD-58650.1 UM	A-119326.2	AAGCAAGAUUU UUUAUAAUA	63	A-119338.1	UAUUUAUUUUUU CUUGCUIUUU	114	NM_001735.2_784 -806_as
AD-58646.1 UM	A-119332.1	CAGAUCAAACAC AAUUUCAGU	64	A-119333.1	ACUGAAAUUGUGUU UGAUCUGCA	115	NM_010406.2_494 5-4967_as
AD-58653.1 UM	A-119332.2	CAGAUCAAACAC AAUUUCAGU	65	A-119341.1	ACUGAAAUUGUGUU UGAUCUGCA	116	NM_010406.2_494 5-4967_as

Таблица 4

Последовательности Модифицированной GalNAC-конъюгированной и Антисмысловой Цепи dsRNA C5

ID дуп- лекса	Смысловая нить	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Анти- смысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Виды_ название олигону- клеотида <sup>4</sup>
AD- 58093.1	A- 118310.1	AfaUfaAfcUfcAfCfUfa UfaAfuUfaCfuUfL96	117	A- 118311.1	aAfgUfaAfuUfaUfaguGfa GfuUfaUfusUfsu	168	
AD- 58099.1	A- 118312.1	UfgAfcAfaAfaUfAfAfc UfcAfcUfaUfaAfL96	118	A- 118313.1	uUfaUfaGfuGfaGfuuaUfu UfuGfuCfasAfsu	169	
AD- 58105.1	A- 118314.1	CfuUfcCfuCfuGfGfAfa AfuUfgGfcCfuUfL96	119	A- 118315.1	aAfgGfcCfaAfuUfuccAfg AfgGfaAfgsCfsa	170	
AD- 58111.1	A- 118316.1	GfaCfaAfaAfuAfAfCfu CfaCfuAfuAfaUfL96	120	A- 118317.1	aUfuAfuAfgUfgAfguuAfu UfuUfgUfcsAfsa	171	
AD- 58117.1	A- 118318.1	UfcCfuCfuGfgAfAfAfu UfgGfcCfuUfcAfL96	121	A- 118319.1	uGfaAfgGfcCfaAfuuuCfc AfgAfgGfasAfsu	172	

AD- 58123.1	A- 118320.1	AfaGfcAfaGfaUfAfUfu UfuUfaUfaAfuAfL96	122	A- 118321.1	uAfuUfaUfaAfaAfaUfc UfuGfcUfusUfsu	173	
AD- 58129.1	A- 118322.1	AfaAfaUfgUfuUfUfUfg UfcAfaGfuAfcAfL96	123	A- 118323.1	uGfuAfcUfuGfaCfaaaAfa CfaUfuUfusCfsu	174	
AD- 58088.1	A- 118324.1	AfuUfuAfaAfcAfAfCfa AfgUfaCfcUfuUfL96	124	A- 118325.1	aAfaGfgUfaCfuUfguuGfu UfuAfaAfusCfsu	175	
AD- 58094.1	A- 118326.1	AfuUfcAfgAfaAfGfUfc UfgUfgAfaGfgAfL96	125	A- 118327.1	uCfcUfuCfaCfaGfacuUfu CfuGfaAfusUfsu	176	
AD- 58100.1	A- 118328.1	AfcAfcUfgAfaGfCfAfu UfuGfaUfgCfaAfL96	126	A- 118329.1	uUfgCfaUfcAfaAfugcUfu CfaGfuGfusAfsu	177	
AD- 58106.1	A- 118330.1	GfcAfgUfuCfuGfUfGfu UfaAfaAfuGfuCfL96	127	A- 118331.1	gAfcAfuUfuUfaAfcacAfg AfaCfuGfcsAfsu	178	
AD- 58112.1	A- 118332.1	AfgGfaUfuUfuGfAfGfu GfuAfaAfaGfgAfL96	128	A- 118333.1	uCfcUfuUfuAfcAfcucAfa AfaUfcCfusUfsu	179	
AD- 58118.1	A- 118334.1	AfaUfgAfuGfaAfCfCfu UfgUfaAfaGfaAfL96	129	A- 118335.1	uUfcUfuUfaCfaAfgguUfc AfuCfaUfusUfsu	180	
AD- 58124.1	A- 118336.1	AfuCfaUfuGfgAfAfCfa UfuUfuUfcAfuUfL96	130	A- 118337.1	aAfuGfaAfaAfaUfguuCfc AfaUfgAfusUfsu	181	
AD- 58130.1	A- 118338.1	AfgCfcAfgAfaAfUfUfc GfgAfgUfuAfuUfL96	131	A- 118339.1	aAfuAfaCfuCfcGfaauUfu CfuGfgCfusUfsg	182	
AD- 58089.1	A- 118340.1	UfcCfcUfgGfgAfGfAfu AfaAfaCfuCfaCfL96	132	A- 118341.1	gUfgAfgUfuUfuAfucuCfc CfaGfgGfasAfsa	183	



AD- 58095.1	A- 118342.1	GfaAfaAfuGfaUfGfAfa CfcUfuGfuAfaAfL96	133	A- 118343.1	uUfuAfcAfaGfgUfucaUfc AfuUfuUfcsUfsu	184	
AD- 58101.1	A- 118344.1	AfuUfgCfuCfaAfGfUfc AfcAfuUfuGfaUfL96	134	A- 118345.1	aUfcAfaAfuGfuGfacuUfg AfgCfaAfusUfsc	185	
AD- 58107.1	A- 118346.1	GfaGfaUfuGfcAfUfAfu GfcUfuAfuAfaAfL96	135	A- 118347.1	uUfuAfuAfaGfcAfuauGfc AfaUfcUfcsUfsg	186	
AD- 58113.1	A- 118348.1	GfuUfaUfcCfuGfAfUfa AfaAfaAfuUfuAfL96	136	A- 118349.1	uAfaAfuUfuUfuUfaucAfg GfaUfaAfcsUfsu	187	
AD- 58119.1	A- 118350.1	AfgGfaAfgUfuUfGfCfa GfcUfuUfuAfuUfL96	137	A- 118351.1	aAfuAfaAfaGfcUfgcaAfa CfuUfcCfusCfsa	188	
AD- 58125.1	A- 118352.1	GfaAfgAfaAfuUfGfAfu CfaUfaUfuGfgAfL96	138	A- 118353.1	uCfcAfaUfaUfgAfucaAfu UfuCfuUfcsUfsa	189	
AD- 58131.1	A- 118354.1	AfuCfcUfgAfuAfAfAfa AfaUfuUfaGfuUfL96	139	A- 118355.1	aAfcUfaAfaUfuUfuuuAfu CfaGfgAfusAfsa	190	
AD- 58090.1	A- 118356.1	UfgGfaAfaAfgAfAfAfu CfuUfaGfuAfaAfL96	140	A- 118357.1	uUfuAfcUfaAfgAfuuuCfu UfuUfcCfasAfsa	191	
AD- 58096.1	A- 118358.1	UfcUfuAfuCfaAfAfGfu AfuAfaAfcAfuUfL96	141	A- 118359.1	aAfuGfuUfuAfuAfcuuUfg AfuAfaGfasUfsg	192	
AD- 58102.1	A- 118360.1	UfcCfcUfaCfaAfAfCfu GfaAfuUfuGfgUfL96	142	A- 118361.1	aCfcAfaAfuUfcAfguuUfg UfaGfgGfasGfsa	193	
AD- 58108.1	A- 118362.1	CfaGfgAfgCfaAfAfCfa UfaUfgUfcAfuUfL96	143	A- 118363.1	aAfuGfaCfaUfaUfguuUfg CfuCfcUfsgUfsc	194	

AD- 58114.1	A- 118364.1	AfcAfuGfuAfaCfAfAfc UfgUfaGfuUfcAfL96	144	A- 118365.1	uGfaAfcUfaCfaGfuugUfu AfcAfuGfusAfsc	195	
AD- 58120.1	A- 118366.1	CfaGfgAfaAfuCfAfUfu GfgAfaCfaUfuUfL96	145	A- 118367.1	aAfaUfgUfuCfcAfaugAfu UfuCfcUfgsUfsu	196	
AD- 58126.1	A- 118368.1	UfuUfaAfgAfaUfUfUfu GfaAfaUfuAfcUfL96	146	A- 118369.1	aGfuAfaUfuUfcAfaaaUfu CfuUfaAfasGfsu	197	
AD- 58132.1	A- 118370.1	UfaUfuCfuGfcAfAfCfu GfaAfuUfcGfaUfL96	147	A- 118371.1	aUfcGfaAfuUfcAfguuGfc AfgAfaUfasAfsc	198	
AD- 58091.1	A- 118372.1	GfcCfcUfuGfgAfAfAfg AfgUfaUfuUfcAfL96	148	A- 118373.1	uGfaAfaUfaCfuCfuuuCfc AfaGfgGfcsUfsu	199	
AD- 58097.1	A- 118374.1	CfcUfgAfuAfaAfAfAfa UfuUfaGfuUfaCfL96	149	A- 118375.1	gUfaAfcUfaAfaUfuuuUfuAf uCfaGfgsAfsu	200	
AD- 58103.1	A- 118376.1	CfcCfuUfgGfaAfAfGfa GfuAfuUfuCfaAfL96	150	A- 118377.1	uUfgAfaAfuAfcUfcuuUfcCfa AfgGfgsCfsu	201	
AD- 58121.1	A- 118382.1	UfgCfaGfaUfcAfAfAfc AfcAfaUfuUfcAfL96	151	A- 118383.1	uGfaAfaUfuGfuGfuuuGfaUfc UfgCfasGfsa	202	
AD- 58133.1	A- 118386.1	CfaGfaUfcAfaAfCfAfc AfaUfuUfcAfgUfL96	152	A- 118387.1	aCfuGfaAfaUfuGfuguUfuGfa UfcUfgsCfsa	203	
AD- 58116.1	A- 118396.1	GfuUfcCfgGfaUfAfUfu UfgAfaCfuUfuUfL96	153	A- 118397.1	aAfaAfgUfuCfaAfauaUfcCfg GfaAfcsCfsg	204	
AD- 58644.1	A- 119328.1	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfa AfgUfaCfcUfuUfL96	154	A- 119329.1	asAfsaGfgUfaCfuUfguuGfu UfuAfaAfuscsu	205	

AD- 58651.1	A- 119328.2	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfa AfgUfaCfcUfuUfL96	155	A- 119339.1	asAfsaGfsgUfsaCfsuUfsguu GfsuUfsuAfsaAfsuscsu	206	
AD- 58641.1	A- 119322.1	UfsgsAfcAfaAfaUfAfAfc UfcAfcUfaUfaAfL96	156	A- 119323.1	usUfsaUfaGfuGfaGfuuaUfu UfuGfuCfasasu	207	
AD- 58648.1	A- 119322.2	UfsgsAfcAfaAfaUfAfAfc UfcAfcUfaUfaAfL96	157	A- 119336.1	usUfsaUfsaGfsuGfsaGfsuua UfsuUfsuGfsuCfsasasu	208	
AD- 58642.1	A- 119324.1	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfu CfaCfuAfuAfaUfL96	158	A- 119325.1	asUfsuAfuAfgUfgAfguuAfu UfuUfgUfcsasa	209	
AD- 58649.1	A- 119324.2	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfu CfaCfuAfuAfaUfL96	159	A- 119337.1	asUfsuAfsuAfgUfsgUfsgUfsguu AfsuUfsuUfsgUfscsasa	210	
AD- 58647.1	A- 119334.1	GfsusUfcCfgGfaUfAfUfu UfgAfaCfuUfuUfL96	160	A- 119335.1	asAfsaAfgUfuCfaAfauaUfc CfgGfaAfcscsg	211	
AD- 58654.1	A- 119334.2	GfsusUfcCfgGfaUfAfUfu UfgAfaCfuUfuUfL96	161	A- 119342.1	asAfsaAfgUfsuCfsaAfsaua UfscCfsgGfsaAfcscscsg	212	
AD- 58645.1	A- 119330.1	UfsgsCfaGfaUfcAfAfAfc AfcAfaUfuUfcAfL96	162	A- 119331.1	usGfsaAfaUfuGfuGfuuuGfa UfcUfgCfasgsa	213	
AD- 58652.1	A- 119330.2	UfsgsCfaGfaUfcAfAfAfc AfcAfaUfuUfcAfL96	163	A- 119340.1	usGfsaAfsaUfsuGfsuGfsuuu GfsaUfscUfsgCfsasgsa	214	
AD- 58643.1	A- 119326.1	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfu UfuUfaUfaAfuAfL96	164	A- 119327.1	usAfsuUfaUfaAfaAfauaUfc UfuGfcUfususu	215	
AD- 58650.1	A- 119326.2	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfu UfuUfaUfaAfuAfL96	165	A- 119338.1	usAfsuUfsaUfsaAfsaAfsaua UfscUfsuGfscUfsususu	216	

AD- 58646.1	A- 119332.1	CfsasGfaUfcAfaAfCfAfc AfaUfuUfcAfgUfL96	166	A- 119333.1	asCfsuGfaAfaUfuGfuguUfuGfa UfcUfgscsa	217	
AD- 58653.1	A- 119332.2	CfsasGfaUfcAfaAfCfAfc AfaUfuUfcAfgUfL96	167	A- 119341.1	asCfsuGfsaAfsaUfsuGfsugu UfsuGfsaUfscUfsgscsa	218	

<sup>4</sup> Название видов олигонуклеотида и положение в нуклеотидной последовательности GenBank записи, на которую нацелена антисмысловая цепь, соответствующая ему, показаны в таблице 3.

Таблица 5

## Последовательности Немодифицированной Смысловой и Антисмысловой Цепи dsRNA C5

ID дуплекса	Смысловая цепь	Смысловая немодифици- рованная последова- тельность	SEQ ID NO:	Анти- смысловая	Антисмысловая немодифици- рованная последователь- ность	SEQ ID NO:	Виды_ название олигонуклеотида
AD- 58143.1 UM	A- 118423.1	CACUAUAAUUAC UUGAUUU	219	A- 118424.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	302	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58149.1 UM	A- 118425.1	UAACUCACUAUA AUUACUU	220	A- 118426.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	303	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58155.1 UM	A- 118427.1	ACAAAUAACUC ACUAUAA	221	A- 118428.1	UUAUAGUGAGUUAUUUUGU	304	NM_001735.2_1511- 1529_as

AD- 58161.1 UM	A- 118429.1	UCCUCUGGAAAU UGGCCUU	222	A- 118430.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	305	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58167.1 UM	A- 118431.1	CAAAUAACUCA CUAUAAU	223	A- 118432.1	AUUUAGUGAGUUUUUUG	306	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58173.1 UM	A- 118433.1	CUCUGGAAAUUG GCCUUCA	224	A- 118434.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	307	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58179.1 UM	A- 118435.1	GCAAGAUUUUU UAUAAUA	225	A- 118436.1	UAUUUAAAAUAUCUUGC	308	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58185.1 UM	A- 118437.1	AAUGUUUUUGUC AAGUACA	226	A- 118438.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	309	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58144.1 UM	A- 118439.1	UUAAACAACAAG UACCUUU	227	A- 118440.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	310	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58150.1 UM	A- 118441.1	UCAGAAAGUCUG UGAAGGA	228	A- 118442.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	311	NM_001735.2_4578- 4596_as

AD- 58156.1 UM	A- 118443.1	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	229	A- 118444.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	312	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58162.1 UM	A- 118445.1	AGUUCUGUGUU AAAUGUC	230	A- 118446.1	GACAUUUUAACACAGAACU	313	NM_001735.2_2591- 2609_as
AD- 58168.1 UM	A- 118447.1	GAUUUUGAGUGU AAAAGGA	231	A- 118448.1	UCCUUUUACACUCAAAAUC	314	NM_001735.2_2955- 2973_as
AD- 58174.1 UM	A- 118449.1	UGAUGAACCUUG UAAAGAA	232	A- 118450.1	UUCUUUACAAGGUUCAUCA	315	NM_001735.2_2025- 2043_as
AD- 58180.1 UM	A- 118451.1	CAUUGGAACAUU UUUCAUU	233	A- 118452.1	AAUGAAAAAUGUCCAAUG	316	NM_001735.2_3118- 3136_as
AD- 58186.1 UM	A- 118453.1	CCAGAAAUUCGG AGUUUUU	234	A- 118454.1	AAUAACUCCGAAUUUCUGG	317	NM_001735.2_2317- 2335_as
AD- 58145.1 UM	A- 118455.1	CCUGGGAGAUAAA ACUCAC	235	A- 118456.1	GUGAGUUUUUAUCUCCCAGG	318	NM_001735.2_3618- 3636_as

AD- 58151.1 UM	A- 118457.1	AAAUGAUGAACC UUGUAAA	236	A- 118458.1	UUUACAAGGUUCAUCAUUU	319	NM_001735.2_2022- 2040_as
AD- 58157.1 UM	A- 118459.1	UGCUCAAGUCACA UUUGAU	237	A- 118460.1	AUCAAAUGUGACUUGAGCA	320	NM_001735.2_918- 936_as
AD- 58163.1 UM	A- 118461.1	GAUUGCAUAUGCU UAUAAA	238	A- 118462.1	UUUAUAAGCAUAUGCAAUC	321	NM_001735.2_4698- 4716_as
AD- 58169.1 UM	A- 118463.1	UAUCCUGAUAAAA AAUUUA	239	A- 118464.1	UAAUUUUUUUAUCAGGAUA	322	NM_001735.2_205- 223_as
AD- 58175.1 UM	A- 118465.1	GAAGUUUGCAGCU UUUAUU	240	A- 118466.1	AAUAAAAGCUGCAAACUUC	323	NM_001735.2_4147- 4165_as
AD- 58181.1 UM	A- 118467.1	AGAAAUUGAUCAU AUUGGA	241	A- 118468.1	UCCAAUAUGAUCAAUUUCU	324	NM_001735.2_555- 573_as
AD- 58187.1 UM	A- 118469.1	CCUGAUAAAAAAU UUAGUU	242	A- 118470.1	AACUAAAUUUUUUUAUCAGG	325	NM_001735.2_208- 226_as

AD- 58146.1 UM	A- 118471.1	GAAAAGAAUUCUU AGUAAA	243	A- 118472.1	UUUACUAAGAUUUUCUUUC	326	NM_001735.2_2786- 2804_as
AD- 58152.1 UM	A- 118473.1	UUAUCAAGUAUA AACAUU	244	A- 118474.1	AAUGUUUAUACUUUGAUAA	327	NM_001735.2_1596- 1614_as
AD- 58158.1 UM	A- 118475.1	CCUACAAACUGAA UUUGGU	245	A- 118476.1	ACCAAUUCAGUUUGUAGG	328	NM_001735.2_1082- 1100_as
AD- 58164.1 UM	A- 118477.1	GGAGCAAACAUAU GUCAUU	246	A- 118478.1	AAUGACAUAUGUUUGCUC	329	NM_001735.2_87- 105_as
AD- 58170.1 UM	A- 118479.1	AUGUAACAACUGU AGUUCA	247	A- 118480.1	UGAACUACAGUUGUACAU	330	NM_001735.2_4109- 4127_as
AD- 58176.1 UM	A- 118481.1	GGAAAUCAUUGGA ACAUUU	248	A- 118482.1	AAAUGUCCAAUGAUUUCC	331	NM_001735.2_3112- 3130_as
AD- 58182.1 UM	A- 118483.1	UAAGAAUUUUGAA AUUACU	249	A- 118484.1	AGUAAUUUCAAAAUUCUUA	332	NM_001735.2_759- 777_as



AD- 58188.1 UM	A- 118485.1	UUCUGCAACUGAA UUCGAU	250	A- 118486.1	AUCGAAUUCAGUUGCAGAA	333	NM_001735.2_4412- 4430_as
AD- 58147.1 UM	A- 118487.1	CCUUGGAAAGAGU AUUUCA	251	A- 118488.1	UGAAAUACUCUUUCCAAGG	334	NM_001735.2_1886- 1904_as
AD- 58153.1 UM	A- 118489.1	UGAUAAAAAUUU AGUUAC	252	A- 118490.1	GUAACUAAAUUUUUUAUCA	335	NM_001735.2_210- 228_as
AD- 58159.1 UM	A- 118491.1	CUUGGAAAGAGU UUUCA	253	A- 118492.1	UUGAAAUACUCUUCCAAG	336	NM_001735.2_1887- 1905_as
AD- 58190.1 UM	A- 118519.1	CACUAUAAUUACU UGAUUU	254	A- 118520.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	337	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58196.1 UM	A- 118521.1	UAACUCACUAUAA UUACUU	255	A- 118522.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	338	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58202.1 UM	A- 118523.1	ACAAAUAACUCA CUAUAA	256	A- 118524.1	UUUAGUGAGUUUUUUUGU	339	NM_001735.2_1511- 1529_as

AD- 58208.1 UM	A- 118525.1	UCCUCUGGAAAUU GGCCUU	257	A- 118526.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	340	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58214.1 UM	A- 118527.1	CAAAUAACUCAC UAUAAU	258	A- 118528.1	AUUUAUAGUGAGUUUUUUG	341	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58220.1 UM	A- 118529.1	CUCUGGAAAUUGG CCUUCA	259	A- 118530.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	342	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58226.1 UM	A- 118531.1	GCAAGAUUUUUU AUAAUA	260	A- 118532.1	UAUUUAUUUUUAUCUUGC	343	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58231.1 UM	A- 118533.1	AAUGUUUUUGUCA AGUACA	261	A- 118534.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	344	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58191.1 UM	A- 118535.1	UUAAACAACAAGU ACCUUU	262	A- 118536.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	345	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58197.1 UM	A- 118537.1	UCAGAAAGUCUGU GAAGGA	263	A- 118538.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	346	NM_001735.2_4578- 4596_as

AD- 58203.1 UM	A- 118539.1	ACUGAAGCAUUUG AUGCAA	264	A- 118540.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	347	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58209.1 UM	A- 118541.1	AGUUCUGUGUUAA AAUGUC	265	A- 118542.1	GACAUUUUAACACAGAACU	348	NM_001735.2_2591- 2609_as
AD- 58233.1 UM	A- 118565.1	CACUAUAAUUACU UGAUUU	266	A- 118566.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	349	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58193.1 UM	A- 118567.1	UAACUCACUAUAA UUACUU	267	A- 118568.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUU	350	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58199.1 UM	A- 118569.1	ACAAAUAACUCA CUAUAA	268	A- 118570.1	UUUAGUGAGUUUUUUUGU	351	NM_001735.2_1511- 1529_as
AD- 58205.1 UM	A- 118571.1	UCCUCUGGAAAUU GGCCUU	269	A- 118572.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	352	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58211.1 UM	A- 118573.1	CAAAAUAACUCAC UAUAAU	270	A- 118574.1	AUUUAGUGAGUUUUUUUG	353	NM_001735.2_1512- 1530_as

AD- 58217.1 UM	A- 118575.1	CUCUGGAAAUUGG CCUUCA	271	A- 118576.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	354	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58223.1 UM	A- 118577.1	GCAAGAUUUUUU AUAAUA	272	A- 118578.1	UAUUUAUUUUUAUCUUGC	355	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58229.1 UM	A- 118579.1	AAUGUUUUUGUC AGUACA	273	A- 118580.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	356	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58234.1 UM	A- 118581.1	UUAAACAACAAGU ACCUUU	274	A- 118582.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	357	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58194.1 UM	A- 118583.1	UCAGAAAGUCUGU GAAGGA	275	A- 118584.1	UCCUUCACAGACUUCUGA	358	NM_001735.2_4578- 4596_as
AD- 58200.1 UM	A- 118585.1	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	276	A- 118586.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	359	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58206.1 UM	A- 118587.1	AGUUCUGUGUUAA AAUGUC	277	A- 118588.1	GACAUUUUAACACAGAACU	360	NM_001735.2_2591- 2609_as

AD- 58236.1 UM	A- 118423.2	CACUAUAAUUACU UGAUUU	278	A- 118644.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	361	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58242.1 UM	A- 118425.2	UAACUCACUAUA AUUACUU	279	A- 118645.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	362	NM_001735.2_1517- 1535_as
AD- 58248.1 UM	A- 118427.2	ACAAAUAACUC ACUAUAA	280	A- 118646.1	UUAUAGUGAGUUUUUGU	363	NM_001735.2_1511- 1529_as
AD- 58254.1 UM	A- 118429.2	UCCUCUGGAAAU UGGCCUU	281	A- 118647.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	364	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58260.1 UM	A- 118431.2	CAAAUAACUCA CUAUAAU	282	A- 118648.1	AUUUAGUGAGUUUUUUG	365	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58266.1 UM	A- 118433.2	CUCUGGAAAUUG GCCUUCA	283	A- 118649.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	366	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58272.1 UM	A- 118435.2	GCAAGAUUUUU UAUAAUA	284	A- 118650.1	UAUUUAAAAAUUCUUGC	367	NM_001735.2_784- 802_as

AD- 58277.1 UM	A- 118437.2	AAUGUUUUUGUC AAGUACA	285	A- 118651.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	368	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58237.1 UM	A- 118439.2	UUAAACAACAAG UACCUUU	286	A- 118652.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	369	NM_001735.2_982- 1000_as
AD- 58243.1 UM	A- 118441.2	UCAGAAAGUCUG UGAAGGA	287	A- 118653.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	370	NM_001735.2_4578- 4596_as
AD- 58249.1 UM	A- 118443.2	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	288	A- 118654.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	371	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58255.1 UM	A- 118445.2	AGUUCUGUGUU AAAAUGUC	289	A- 118655.1	GACAUUUUAACACAGAACU	372	NM_001735.2_2591- 2609_as
AD- 58279.1 UM	A- 118423.3	CACUAUAAUUA CUUGAUUU	290	A- 118667.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	373	NM_001735.2_1522- 1540_as
AD- 58239.1 UM	A- 118425.3	UAACUCACUAUA AUUACUU	291	A- 118668.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUA	374	NM_001735.2_1517- 1535_as

AD- 58245.1 UM	A- 118427.3	ACAAAUAACUC ACUAUAA	292	A- 118669.1	UUAUAGUGAGUUAUUUUGU	375	NM_001735.2_1511- 1529_as
AD- 58251.1 UM	A- 118429.3	UCCUCUGGAAAUU GGCCUU	293	A- 118670.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	376	NM_001735.2_2733- 2751_as
AD- 58257.1 UM	A- 118431.3	CAAAUAACUCAC UAUAAU	294	A- 118671.1	AUUUAGUGAGUUAUUUUG	377	NM_001735.2_1512- 1530_as
AD- 58263.1 UM	A- 118433.3	CUCUGGAAAUUG GCCUUCA	295	A- 118672.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	378	NM_001735.2_2735- 2753_as
AD- 58269.1 UM	A- 118435.3	GCAAGAUUUUU UAUAAUA	296	A- 118673.1	UAUUUAAAAUAUCUUGC	379	NM_001735.2_784- 802_as
AD- 58275.1 UM	A- 118437.3	AAUGUUUUUGUC AAGUACA	297	A- 118674.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	380	NM_001735.2_4744- 4762_as
AD- 58280.1 UM	A- 118439.3	UUAAACAACAAGU ACCUUU	298	A- 118675.1	AAAGGUACUUGUUGUUUAA	381	NM_001735.2_982- 1000_as

AD- 58240.1 UM	A- 118441.3	UCAGAAAGUCUGU GAAGGA	299	A- 118676.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	382	NM_001735.2_4578- 4596_as
AD- 58246.1 UM	A- 118443.3	ACUGAAGCAUUU GAUGCAA	300	A- 118677.1	UUGCAUCAAAUGCUUCAGU	383	NM_001735.2_169- 187_as
AD- 58252.1 UM	A- 118445.3	AGUUCUGUGUUA AAAUGUC	301	A- 118678.1	GACAUUUUAACACAGAACU	384	NM_001735.2_2591- 2609_as

Таблица 6

## Последовательности Модифицированной Смысловой и Антисмысловой Цепи dsRNA C5

ID дуп- лекса	Смысловая цепь	Смысловая последова- тельность	SEQ ID NO:	Анти- смысловая	Антисмысловая последова- тельность	SEQ ID NO:	Виды_ название олиго Нуклео- тида <sup>5</sup>
AD- 58143.1	A- 118423.1	cAcuAuAAuuAcuu GAuuudTsdT	385	A-118424.1	AAAUcAAGuAAUuAuA GUGdTsdT	468	
AD- 58149.1	A- 118425.1	uAAcucAcuAuAAuu AcuudTsdT	386	A-118426.1	AAGuAAUuAuAGUGAG UuAdTsdT	469	
AD- 58155.1	A- 118427.1	AcAAAAuAAcucAcu AuAAdTsdT	387	A-118428.1	UuAuAGUGAGUuAUUU UGUdTsdT	470	



AD- 58161.1	A- 118429.1	uccucuGGAAuuGG ccuudTsdT	388	A-118430.1	AAGGCcAAUUUCcAGAG GAdTsdT	471	
AD- 58167.1	A- 118431.1	cAAAAuAAcucAcuAu AAudTsdT	389	A-118432.1	AUuAuAGUGAGUuAUU UUGdTsdT	472	
AD- 58173.1	A- 118433.1	cucuGGAAuuGGccu ucAdTsdT	390	A-118434.1	UGAAGGCcAAUUUCcAGA GdTsdT	473	
AD- 58179.1	A- 118435.1	GcAAGAuAuuuuuAu AAuAdTsdT	391	A-118436.1	uAUuAuAAAAuAUCU UGCdTsdT	474	
AD- 58185.1	A- 118437.1	AAuGuuuuuGucAAGu AcAdTsdT	392	A-118438.1	UGuACUUGAcAAAAcA UUdTsdT	475	
AD- 58144.1	A- 118439.1	uuAAAcAAcAAGuAccu uudTsdT	393	A-118440.1	AAAGGuACUUGUUGUUu AAdTsdT	476	
AD- 58150.1	A- 118441.1	ucAGAAAGucuGuGAAG GAdTsdT	394	A-118442.1	UCCUUcAcAGACUUUC UGAdTsdT	477	
AD- 58156.1	A- 118443.1	AcuGAAGcAuuuGAuGc AAdTsdT	395	A-118444.1	UUGcAUcAAAUGCUUcA GUdTsdT	478	
AD- 58162.1	A- 118445.1	AGuucuGuGuuAAAAuG ucdTsdT	396	A-118446.1	GAcAUUUuAAcAcAGAA CUdTsdT	479	
AD- 58168.1	A- 118447.1	GAuuuuGAGuGuAAAAG GAdTsdT	397	A-118448.1	UCCUUUuAcACUcAAAA UCdTsdT	480	
AD- 58174.1	A- 118449.1	uGAuGAAccuuGuAAAG AAdTsdT	398	A-118450.1	UUCUUuAcAAGGUUcAU cAdTsdT	481	

AD- 58180.1	A- 118451.1	cAuuGGAACAuuuuuuCA uudTsdT	399	A-118452.1	AAUGAAAAAUGUUCcAA UGdTsdT	482	
AD- 58186.1	A- 118453.1	ccAGAAAuucGGAGuuA uudTsdT	400	A-118454.1	AAuAACUCCGAAUUUCU GGdTsdT	483	
AD- 58145.1	A- 118455.1	ccuGGGAGAuAAAAcuc AcdTsdT	401	A-118456.1	GUGAGUUUuAUCUCCcA GGdTsdT	484	
AD- 58151.1	A- 118457.1	AAuGAuGAAccuuGuA AAdTsdT	402	A-118458.1	UUuAcAAGGUUCAUcAU UUdTsdT	485	
AD- 58157.1	A- 118459.1	uGcucAAGucAcAuuuGA udTsdT	403	A-118460.1	AUCAAAUGUGACUUGAGc AdTsdT	486	
AD- 58163.1	A- 118461.1	GAuuGcAuAuGcuuAuAA AdTsdT	404	A-118462.1	UUuAuAAGcAuAUGcAAU CdTsdT	487	
AD- 58169.1	A- 118463.1	uAuccuGAuAAAAAuuu AdTsdT	405	A-118464.1	uAAAUUUUuAUcAGGAu AdTsdT	488	
AD- 58175.1	A- 118465.1	GAAGuuuGcAGcuuuu AuudTsdT	406	A-118466.1	AAuAAAAGCUGcAAACU UCdTsdT	489	
AD- 58181.1	A- 118467.1	AGAAuuGAucAuAuuG GAdTsdT	407	A-118468.1	UCcAAuAUGAUcAAUUU CUdTsdT	490	
AD- 58187.1	A- 118469.1	ccuGAuAAAAAuuuAG uudTsdT	408	A-118470.1	AACuAAAUUUUuAUcA GGdTsdT	491	
AD- 58146.1	A- 118471.1	GAAAAGAAucuuAGuAA AdTsdT	409	A-118472.1	UUuACuAAGAUUUCUU UUCdTsdT	492	

AD- 58152.1	A- 118473.1	uuAucAAAGuAuAAAcA uudTsdT	410	A-118474.1	AAUGUUuAuACUUUGAu AAdTsdT	493	
AD- 58158.1	A- 118475.1	ccuAcAAAcuGAAuuuGG udTsdT	411	A-118476.1	ACcAAAUUCAGUUUGuA GGdTsdT	494	
AD- 58164.1	A- 118477.1	GGAGcAAAcAuAuGucAu udTsdT	412	A-118478.1	AAUGAcAuAUGUUUGCU CCdTsdT	495	
AD- 58170.1	A- 118479.1	AuGuAAcAAcuGuAGuuc AdTsdT	413	A-118480.1	UGAACuAcAGUUGUuAc AUdTsdT	496	
AD- 58176.1	A- 118481.1	GGAAUcAuuGGAAcAuu udTsdT	414	A-118482.1	AAAUGUUCcAAUGAUUU CCdTsdT	497	
AD- 58182.1	A- 118483.1	uAAGAAuuuuGAAuuAc udTsdT	415	A-118484.1	AGuAAUUUCAAAAUUC UuAdTsdT	498	
AD- 58188.1	A- 118485.1	uucuGcAAcuGAAuucGA udTsdT	416	A-118486.1	AUCGAAUUCAGUUGcA GAAdTsdT	499	
AD- 58147.1	A- 118487.1	ccuuGGAAAGAGuAuuuc AdTsdT	417	A-118488.1	UGAAAUACUCUUUCcAA GGdTsdT	500	
AD- 58153.1	A- 118489.1	uGAuAAAAAAuuuAGuuA cdTsdT	418	A-118490.1	GuAACuAAAUUUUuAU cAdTsdT	501	
AD- 58159.1	A- 118491.1	cuuGGAAAGAGuAuuucA AdTsdT	419	A-118492.1	UUGAAAUACUCUUUCcA AGdTsdT	502	
AD- 58190.1	A- 118519.1	CACUAUAAUUACUUGAUU UdTdT	420	A-118520.1	AAAUCAAGUAAUUAUA GUGdTdT	503	

AD- 58196.1	A- 118521.1	UAACUCACUAUAAUUAC UUdTdT	421	A-118522.1	AAGUAAUUUAGUGAGU UAdTdT	504	
AD- 58202.1	A- 118523.1	ACAAAUAACUCACUAU AAdTdT	422	A-118524.1	UUUAGUGAGUUUUUU UdTdT	505	
AD- 58208.1	A- 118525.1	UCCUCUGGAAUUGGCC UUdTdT	423	A-118526.1	AAGGCCAAUUCCAGAG GAdTdT	506	
AD- 58214.1	A- 118527.1	CAAAUAACUCACUAUA AUdTdT	424	A-118528.1	AUUUAGUGAGUUUU UUGdTdT	507	
AD- 58220.1	A- 118529.1	CUCUGGAAUUGGCCUU CAdTdT	425	A-118530.1	UGAAGGCCAAUUCCAG AGdTdT	508	
AD- 58226.1	A- 118531.1	GCAAGAUUUUUUAUA AUAdTdT	426	A-118532.1	UAUUUAAAAUAUCUU GCdTdT	509	
AD- 58231.1	A- 118533.1	AAUGUUUUUGUCAAGUA CAdTdT	427	A-118534.1	UGUACUUGACAAAACA UUdTdT	510	
AD- 58191.1	A- 118535.1	UUAACAACAAGUACCU UUdTdT	428	A-118536.1	AAAGGUACUUGUUGUUU AAdTdT	511	
AD- 58197.1	A- 118537.1	UCAGAAAGUCUGUGAAG GAdTdT	429	A-118538.1	UCCUUCACAGACUUUCU GAdTdT	512	
AD- 58203.1	A- 118539.1	ACUGAAGCAUUUGAUGC AAdTdT	430	A-118540.1	UUGCAUCAAUGCUUCAG UdTdT	513	
AD- 58209.1	A- 118541.1	AGUUCUGUGUUAAAUG UCdTdT	431	A-118542.1	GACAUUUUAACACAGAA CUdTdT	514	

AD- 58233.1	A- 118565.1	CfACfUfAUfAAUfUfAC fUfUfGAUfUfUfdTsdT	432	A-118566.1	AAAUCfAAGUfAAUfA UfAGUGdTsdT	515	
AD- 58193.1	A- 118567.1	UfAACfUfCfACfUfAU fAAUfUfACfUfUfdTsdT	433	A-118568.1	AAGUfAAUfAUfAGUG AGUfAdTsdT	516	
AD- 58199.1	A- 118569.1	ACfAAAAUfAACfUfCfA CfUfAUfAAdTsdT	434	A-118570.1	UUfAUfAGUGAGUUfAU UUUGUdTsdT	517	
AD- 58205.1	A- 118571.1	UfCfCfUfCfUfGGAAAU fUfGGCfCfUfUfdTsdT	435	A-118572.1	AAGGCCfAAUUUCCfAG AGGAdTsdT	518	
AD- 58211.1	A- 118573.1	CfAAAAUfAACfUfCfAC fUfAUfAAUfdTsdT	436	A-118574.1	AUUfAUfAGUGAGUUfA UUUUGdTsdT	519	
AD- 58217.1	A- 118575.1	CfUfCfUfGGAAAUfUfG GCfCfUfUfCfAdTsdT	437	A-118576.1	UGAAGGCCfAAUUUCCfA GAGdTsdT	520	
AD- 58223.1	A- 118577.1	GCfAAGAUfAUfUfUfU fUfAUfAAUfAdTsdT	438	A-118578.1	UfAUUfAUfAAAAUfA UCUUGCdTsdT	521	
AD- 58229.1	A- 118579.1	AAUfGUfUfUfUfUfGU fcfAAGUfACfAdTsdT	439	A-118580.1	UGUfACUUGACfAAAAA CfAUUdTsdT	522	
AD- 58234.1	A- 118581.1	UfUfAAACfAACfAAGUf ACfCfUfUfUfdTsdT	440	A-118582.1	AAAGGUfACUUGUUGUUU fAAdTsdT	523	
AD- 58194.1	A- 118583.1	UfCfAGAAAGUfCfUfGU fGAAGGAdTsdT	441	A-118584.1	UCCUUCfACfAGACUUU CUGAdTsdT	524	
AD- 58200.1	A- 118585.1	ACfUfGAAGCfAUfUfUf GAUfGCfAAdTsdT	442	A-118586.1	UUGCfAUCfAAAUGCUU CfAGUdTsdT	525	

AD- 58206.1	A- 118587.1	AGUfUfCfUfGUfGUfUf AAAAUfGUfCfdTsdT	443	A-118588.1	GACfAUUUUfAACfACfA GAACUdTsdT	526	
AD- 58236.1	A- 118423.2	cAcuAuAAuuAcuuGAuu udTsdT	444	A-118644.1	AAAUcAAGuAAUuAuAG uGdTsdT	527	
AD- 58242.1	A- 118425.2	uAAcucAcuAuAAuuAcu udTsdT	445	A-118645.1	AAGuAAUuAuAGuGAGU uAdTsdT	528	
AD- 58248.1	A- 118427.2	AcAAAAuAAcucAcuAuA AdTsdT	446	A-118646.1	UuAuAGuGAGUuAuUuu GUdTsdT	529	
AD- 58254.1	A- 118429.2	uccucuGGAAAUuGGccu udTsdT	447	A-118647.1	AAGGCcAAuUUCcAGAGG AdTsdT	530	
AD- 58260.1	A- 118431.2	cAAAAuAAcucAcuAuAA udTsdT	448	A-118648.1	AUuAuAGuGAGUuAuUuu GdTsdT	531	
AD- 58266.1	A- 118433.2	cucuGGAAAUuGGccuu cAdTsdT	449	A-118649.1	uGAAGGCcAAuUUCcAG AGdTsdT	532	
AD- 58272.1	A- 118435.2	GcAAGAuAuuuuuAuAA uAdTsdT	450	A-118650.1	uAUuAuAAAAAuAUCuuG CdTsdT	533	
AD- 58277.1	A- 118437.2	AAuGuuuuuGucAAGuA cAdTsdT	451	A-118651.1	uGuACuuGAcAAAAAcAu UdTsdT	534	
AD- 58237.1	A- 118439.2	uuAAAcAAcAAGuAccu uudTsdT	452	A-118652.1	AAAGGuACuuGuuGuUuA AdTsdT	535	
AD- 58243.1	A- 118441.2	ucAGAAAGucuGuGAAG GAdTsdT	453	A-118653.1	UCCuUcAcAGACuUUCuGA dTsdT	536	

AD- 58249.1	A- 118443.2	AcuGAAGcAuuuGAuGc AAdTsdT	454	A-118654.1	uuGcAUcAAAuGCuUcAGU dTsdT	537	
AD- 58255.1	A- 118445.2	AGuucuGuGuuAAAAuG ucdTsdT	455	A-118655.1	GAcAuUUuAAcAcAGAACU dTsdT	538	
AD- 58279.1	A- 118423.3	cAcuAuAAuuAcuuGAu uudTsdT	456	A-118667.1	AAAUCAAGuAAuuAuAgug dTsdT	539	
AD- 58239.1	A- 118425.3	uAAcucAcuAuAAuuAc uudTsdT	457	A-118668.1	AAGuAAuUAuAGuGAGuua dTsdT	540	
AD- 58245.1	A- 118427.3	AcAAAAuAAcucAcuAu AAdTsdT	458	A-118669.1	UuAuAGuGAGuuAuuuugu dTsdT	541	
AD- 58251.1	A- 118429.3	uccucuGGAAAuuGGcc uudTsdT	459	A-118670.1	AAGGCCAAuUuCCAGAgg dTsdT	542	
AD- 58257.1	A- 118431.3	cAAAAuAAcucAcuAuA AudTsdT	460	A-118671.1	AuUAuAGuGAGuuAuuuug dTsdT	543	
AD- 58263.1	A- 118433.3	cucuGGAAAuuGGccuu cAdTsdT	461	A-118672.1	UGAAGGCCAAuuuCCAgag dTsdT	544	
AD- 58269.1	A- 118435.3	GcAAGAuAuuuuuAuAA uAdTsdT	462	A-118673.1	UAuUAuAAAAAuAuCuugcd TsdT	545	
AD- 58275.1	A- 118437.3	AAuGuuuuuGucAAGuA cAdTsdT	463	A-118674.1	UGuACuUGACAAAAACauu dTsdT	546	
AD- 58280.1	A- 118439.3	uuAAAcAAcAAGuAccu uudTsdT	464	A-118675.1	AAAGGuACuUGuuGuuuua dTsdT	547	

AD- 58240.1	A- 118441.3	ucAGAAAGucuGuGAAG GAdTsdT	465	A-118676.1	UCCuUCACAGACuuuCuga dTsdT	548	
AD- 58246.1	A- 118443.3	AcuGAAGcAuuuGAuGc AAdTsdT	466	A-118677.1	UuGCAUCAAAuGCuuCagu dTsdT	549	
AD- 58252.1	A- 118445.3	AGuucuGuGuuAAAAuG ucdTsdT	467	A-118678.1	GACAUuUAACACAGAcud TsdT	550	

<sup>5</sup> Название видов олигонуклеотида и положение в нуклеотидной последовательности GenBank записи, на которую нацелена антисмысловая цепь, соответствующая ему, показаны в таблице 5.



Таблица 7

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

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

AD-58120.1	7,65	10,57	0,58	3,56
AD-58126.1	8,45	15,39	2,08	7,42
AD-58132.1	8,50	19,26	2,52	9,38
AD-58091.1	8,68	18,05	2,95	6,62
AD-58097.1	9,31	23,02	0,67	10,10
AD-58103.1	8,53	17,23	2,90	7,27
AD-1955	57,41	81,16	10,76	5,29
Имитация	78,61	75,97	5,70	2,76
Необработанные	100	100	6,13	5,98

Таблица 8

Тест трансфекции разовой дозы С5 в первичных гепатоцитах мыши с GalNAC-конъюгированными иРНК

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

Таблица 9

Тест разовой дозы С5 в первичных гепатоцитах яванского макака с GalNAC-конъюгированными иРНК

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

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

Таблица 10

Тест свободного поглощения разовой дозы С5 в первичных гепатоцитах  
мыши с GalNAC-конъюгированными иРНК

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

Таблица 11

Значения  $IC_{50}$  в первичных гепатоцитах яванского макака с GalNAC-  
конъюгированными иРНК

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

Таблица 12

Значения  $IC_{50}$  в первичных гепатоцитах мыши с GalNAC-  
конъюгированными иРНК

ID дуплекса	$IC_{50}$ (нМ)	STDEV
AD-58099	3,777	0,122
AD-58111	0,622	2,421
AD-58123	0,549	1,626
AD-58088	9,513	2,588
AD-58121	2,169	1,176
AD-58133	3,802	1,006
AD-58116	2,227	0,604
AD-58644.1	4,596	0,3506
AD-58651.1	59,76	51,99
AD-58641.1	0,82	0,2618
AD-58648.1	7,031	1,256
AD-58642.1	0,5414	0,7334
AD-58649.1	3,32	4,922
AD-58647.1	1,356	0,5215

AD-58654.1	2,09	0,8338
AD-58645.1	2,944	0,3315
AD-58652.1	5,316	2,477
AD-58643.1	2,179	1,112
AD-58650.1	8,223	3,76
AD-58646.1	2,581	0,8186
AD-58653.1	2,451	1,249

Таблица 13

Тест разовой дозы С5 в клетках Нер3В с модифицированными и немодифицированными иРНК

Дуплекс	1 нМ AVG	0,01 нМ AVG	1 нМ STDEV	0,01 нМ STDEV
AD-58143.1	12,13	100,58	3,47	3,94
AD-58149.1	10,46	64,97	0,98	0,00
AD-58155.1	44,88	76,24	1,56	3,74
AD-58161.1	8,51	102,30	1,06	0,50
AD-58167.1	6,54	76,24	1,15	3,74
AD-58173.1	6,85	107,44	0,85	4,74
AD-58179.1	10,19	78,07	0,59	1,15
AD-58185.1	29,46	79,99	3,64	0,78
AD-58144.1	16,82	81,95	1,09	0,40
AD-58150.1	11,05	76,20	2,55	0,00
AD-58156.1	25,92	76,73	2,72	1,50
AD-58162.1	13,25	71,89	0,43	3,87
AD-58168.1	9,74	45,16	0,52	1,11
AD-58174.1	4,84	70,14	0,25	2,75
AD-58180.1	9,41	56,77	1,91	1,95
AD-58186.1	9,97	68,91	1,03	0,34
AD-58145.1	14,29	103,38	1,94	2,03
AD-58151.1	10,16	81,17	1,71	4,77
AD-58157.1	4,72	63,19	1,05	0,00

AD-58163.1	4,95	40,13	1,65	0,59
AD-58169.1	17,02	83,10	1,88	2,04
AD-58175.1	8,30	62,54	0,28	0,31
AD-58181.1	21,89	55,26	4,22	3,52
AD-58187.1	61,96	71,12	2,61	2,79
AD-58146.1	14,25	95,23	2,64	6,53
AD-58152.1	11,22	70,09	0,80	7,88
AD-58158.1	7,96	98,86	0,76	4,36
AD-58164.1	11,60	43,83	2,06	3,43
AD-58170.1	12,28	39,59	0,96	1,36
AD-58176.1	6,89	38,77	1,04	1,33
AD-58182.1	18,65	55,78	0,96	0,55
AD-58188.1	5,40	69,39	1,07	0,34
AD-58147.1	8,22	106,66	0,77	2,61
AD-58153.1	68,10	104,17	4,44	18,29
AD-58159.1	8,76	81,41	1,54	2,79
AD-58190.1	21,94	77,26	2,23	0,76
AD-58196.1	15,97	72,43	1,07	5,32
AD-58202.1	11,99	93,83	5,34	2,76
AD-58208.1	18,63	52,07	12,88	2,55
AD-58214.1	6,85	94,15	0,51	2,31
AD-58220.1	11,50	78,34	3,85	0,77
AD-58226.1	5,77	57,75	1,71	1,13
AD-58231.1	7,23	75,67	1,07	0,74
AD-58191.1	35,40	66,17	5,50	4,21
AD-58197.1	12,05	67,49	1,70	0,33
AD-58203.1	15,16	66,80	1,46	1,31
AD-58209.1	7,58	71,23	3,58	6,28
AD-58233.1	27,01	86,02	0,86	0,42
AD-58193.1	15,37	99,85	1,44	0,00
AD-58199.1	21,52	78,39	6,02	16,40
AD-58205.1	24,13	78,88	5,46	0,77

AD-58211.1	16,38	32,37	2,61	0,48
AD-58217.1	12,23	70,16	0,29	3,44
AD-58223.1	8,51	72,85	3,01	1,79
AD-58229.1	5,50	75,93	1,96	0,37
AD-58234.1	46,86	101,94	15,59	0,00
AD-58194.1	14,49	107,05	2,47	4,20
AD-58200.1	16,21	61,04	0,96	1,20
AD-58206.1	13,25	37,73	2,82	2,03
AD-58236.1	8,29	119,17	1,16	2,92
AD-58242.1	12,05	102,69	0,44	4,03
AD-58248.1	62,78	83,41	15,22	3,27
AD-58254.1	11,18	100,54	1,59	0,00
AD-58260.1	8,42	71,84	1,10	0,35
AD-58266.1	14,05	92,21	1,91	2,26
AD-58272.1	22,63	81,11	1,62	1,59
AD-58277.1	70,51	75,67	4,80	0,74
AD-58237.1	28,10	98,56	1,96	5,79
AD-58243.1	14,16	86,05	1,11	2,95
AD-58249.1	77,08	96,45	15,14	0,95
AD-58255.1	12,27	47,89	2,58	0,00
AD-58279.1	25,78	94,13	5,52	0,46
AD-58239.1	22,98	83,45	0,28	4,91
AD-58245.1	89,60	90,93	15,24	0,45
AD-58251.1	28,39	86,32	7,29	0,00
AD-58257.1	48,97	64,53	9,10	1,90
AD-58263.1	9,14	83,39	1,27	1,63
AD-58269.1	83,84	75,94	15,90	1,12
AD-58275.1	10,29	86,32	0,73	0,85
AD-58280.1	72,77	110,04	7,44	3,24
AD-58240.1	65,42	75,69	3,82	2,23
AD-58246.1	59,19	65,88	28,95	0,65
AD-58252.1	15,35	97,26	1,14	7,62



Имитация	76,53	66,57	14,26	4,72
AD-1955	72,30	82,72	19,54	49,99
Необработанные	100,00	100,00	21,68	26,78

Таблица 14

Тест разовой дозы С5 в первичных гепатоцитах мыши с  
модифицированными и немодифицированными иРНК

ID дуплекса	1 нМ AVG	0,1 нМ AVG	1 нМ STDEV	0,1 нМ STDEV
AD-58143.1	4,51	81,77	3,13	8,75
AD-58149.1	4,65	73,16	3,14	20,17
AD-58155.1	65,56	79,74	4,66	9,36
AD-58161.1	16,82	81,11	6,22	7,43
AD-58167.1	4,72	77,12	1,17	14,25
AD-58173.1	5,57	76,00	3,14	13,52
AD-58179.1	14,55	77,88	1,44	18,40
AD-58185.1	15,69	72,59	8,67	7,81
AD-58144.1	8,70	91,49	0,90	7,08
AD-58150.1	12,51	84,01	1,64	8,20
AD-58156.1	18,23	97,32	1,47	19,50
AD-58162.1	7,72	78,89	5,19	13,80
AD-58190.1	11,86	92,80	2,82	4,41
AD-58196.1	7,27	82,71	1,39	31,81
AD-58202.1	10,67	87,11	1,04	35,79
AD-58208.1	32,21	74,39	8,60	27,45
AD-58214.1	4,24	67,63	0,45	17,85
AD-58220.1	13,64	96,14	4,56	14,36
AD-58226.1	3,83	63,44	1,30	11,94
AD-58231.1	5,95	82,24	2,80	17,36
AD-58191.1	14,50	99,50	5,48	5,53
AD-58197.1	16,12	93,09	0,81	3,21
AD-58203.1	12,52	104,63	5,98	6,02

AD-58209.1	8,79	59,35	3,05	13,07
AD-58233.1	9,50	64,26	5,69	8,70
AD-58193.1	8,88	89,60	3,36	3,08
AD-58199.1	13,56	87,14	2,18	6,44
AD-58205.1	46,84	89,13	4,48	17,16
AD-58211.1	13,10	111,62	1,10	21,54
AD-58217.1	29,79	117,49	11,85	20,41
AD-58223.1	20,53	105,44	1,94	2,98
AD-58229.1	13,76	98,15	1,05	9,03
AD-58234.1	12,33	71,34	0,72	4,17
AD-58194.1	14,02	90,60	1,39	15,64
AD-58200.1	5,25	90,95	1,37	31,70
AD-58206.1	8,19	109,47	3,99	21,75
AD-58236.1	2,07	70,19	0,80	20,59
AD-58242.1	4,76	53,26	1,59	11,56
AD-58248.1	62,42	78,23	5,47	25,85
AD-58254.1	16,47	70,22	2,92	21,74
AD-58260.1	2,84	75,65	0,38	11,59
AD-58266.1	40,70	89,88	16,05	11,57
AD-58272.1	21,42	59,44	13,29	10,98
AD-58277.1	71,72	121,44	16,35	21,16
AD-58237.1	11,85	112,68	9,22	12,88
AD-58243.1	10,46	90,64	3,42	4,33
AD-58249.1	71,47	113,30	4,30	3,84
AD-58255.1	6,86	78,55	2,22	28,37
AD-58279.1	7,15	74,96	2,84	4,72
AD-58239.1	13,64	106,45	1,87	8,25
AD-58245.1	68,67	112,08	21,89	7,73
AD-58251.1	47,01	133,20	4,69	7,14
AD-58257.1	30,68	87,51	2,87	32,84
AD-58263.1	7,22	83,23	2,55	37,50
AD-58269.1	78,90	106,06	5,07	3,04

AD-58275.1	8,92	95,77	1,91	7,14
AD-58280.1	16,67	78,47	4,15	6,06
AD-58240.1	71,03	138,54	5,32	10,87
AD-58246.1	71,87	89,02	4,95	8,63
AD-58252.1	4,04	56,10	1,23	12,02
Имитация	66,84	82,81	2,75	17,19
AD-1955	87,44	102,07	3,64	4,08
Необработанные	100,00	100,00	15,25	18,37

Таблица 15

Значения  $IC_{50}$  в клетках Нер3В с модифицированными и немодифицированными иРНК

ID дуплекса	$IC_{50}$ (пМ)	STDEV
AD-58143.1	36,35	12,26
AD-58149.1	5,735	6,196
AD-58161.1	78,12	26,64
AD-58167.1	31,03	18,14
AD-58173.1	29,12	16,53
AD-58236.1	52,73	32,02
AD-58242.1	8,859	4,321
AD-58260.1	7,706	5,094
AD-58263.1	96,64	47,61

Таблица 16

Значения  $IC_{50}$  в первичных гепатоцитах мыши с модифицированными и немодифицированными иРНК

ID дуплекса	$IC_{50}$ (пМ)	STDEV
AD-58260.1	1,015	0,9676
AD-58149.1	1,309	1,749
AD-58167.1	1,991	2,477
AD-58242.1	0,5866	1,8
AD-58236.1	0,4517	0,06392

AD-58143.1	0,8876	0,1613
AD-58279.1	3,116	0,7368
AD-58252.1	7,153	1,021
AD-58173.1	7,144	19,88
AD-58263.1	3,224	5,478

### Пример 3. Скрининг *in vivo*

Выбирали подгруппу семи GalNAC-конъюгированных иРНК для дальнейшего исследования *in vivo*.

Мышам линии C57BL/6 (количество=3 на группу) подкожно инъецировали 10 мг/кг GalNAC-конъюгированных дуплексов или равным объемом 1х физиологического раствора, забуференного фосфатом Дульбекко (DPBS) (Life Technologies, номер по каталогу 14040133). Сорок восемь часов спустя мышей умерщвляли и иссекали печень и мгновенно замораживали в жидком азоте. Печень измельчали в 2 000 Geno/Grinder (SPEX, SamplePrep, Metuchen, Нью-Джерси). Применяли приблизительно 10 мг порошка печени на образец для выделения РНК. Образцы сначала гомогенизировали в TissueLyserII (Qiagen Inc., Валенсия, Калифорния), а затем экстрагировали РНК с набора RNeasy 96 Universal Tissue Kit (Qiagen Inc., номер по каталогу 74881) в соответствии с протоколом производителя с использованием вакуум/отжим технологии. Концентрацию РНК измеряли NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавэр) и доводили до 100 нг мкл. кДНК и RT-PCR проводили, как описано выше.

Результаты теста разовой дозы показаны на фигуре 2. Таблица 17 показывает результаты теста разовой дозы *in vivo* с указанными GalNAC-конъюгированными модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества mRNA по отношению к обработанным DPBS мышам. В столбце "Эксперименты" перечислен ряд экспериментов, из которых было рассчитано среднее значение. Стандартное отклонение вычисляли у всех мышей в группе во всех анализируемых экспериментах.

Тест разовой дозы C5 *in vivo*

ID дуплекса	Эксперименты	AVG	STDEV
AD-58088.2	2	82,66	13,54
AD-58644.1	1	37,79	9,63
AD-58651.1	1	75,33	5,21
AD-58099.2	2	71,94	15,45
AD-58641.1	1	20,09	4,09
AD-58648.1	1	48,43	9,07
AD-58111.2	3	67,17	13,60
AD-58642.1	2	21,78	5,32
AD-58649.1	1	45,30	14,02
AD-58116.2	2	70,16	10,32
AD-58647.1	1	26,77	4,14
AD-58654.1	1	50,06	27,85
AD-58121.2	2	52,56	13,00
AD-58645.1	1	24,60	1,29
AD-58652.1	1	52,67	3,87
AD-58123.2	2	65,70	9,60
AD-58643.1	1	23,21	2,41
AD-58650.1	1	46,75	14,10
AD-58133.2	3	51,98	13,45
AD-58646.1	2	28,67	5,34
AD-58653.1	1	43,02	10,61
PBS	3	100,00	9,03

Две наиболее эффективных GalNa- конъюгированных иРНК далее модифицировали с включением дополнительных фосфотиоатных связей (таблица 18) и эффективность этих дуплексов определяли *in vivo*, как описано выше. Результаты теста разовой дозы показаны на фигуре 3 и демонстрируют, что средства, представляющие собой иРНК, с дополнительными фосфотиоатными связями являются более эффективными, чем те средства, представляющие собой иРНК, которые не имеют или содержат меньшее количество фосфотиоатных связей.

GalNAC- Конъюгированные иРНК С5, Модифицированные Фосфотиоатными связями

ID дуплекса	Смысловая нить	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Перекрестная Реактивность
AD-58642.1	A-119324.1	GfsasCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	551	A-119325.1	asUfsuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsasa	555	HumRheMusRat
AD-58111.2	A-118316.1	GfaCfaAfaAfuAfAfCfuCfaCfuAfuAfaUfL96	552	A-118317.1	aUfuAfuAfgUfgAfguuAfuUfuUfgUfcsAfsa	556	HumRheMusRat
AD-58646.1	A-119332.1	CfsasGfaUfcAfaAfCfAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	553	A-119333.1	asCfsuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgscsa	557	MusRat
AD-58133.2	A-118386.1	CfaGfaUfcAfaAfCfAfcAfaUfuUfcAfgUfL96	554	A-118387.1	aCfuGfaAfaUfuGfuguUfuGfaUfcUfgsCfsa	558	MusRat

С учетом влияния дополнительных фосфотиоатных связей на способности сайленсинга у средств, представляющих собой иРНК, описанных выше, эффективность дополнительных дуплексов GalNAC-конъюгированной РНК, содержащей фосфотиоатные связи (таблица 19), определяли *in vivo*, как описано выше. Результаты этого теста разовой дозы показаны на фигуре 4.

Продолжительность сайленсинга AD-58642 *in vivo* определяли путем введения разовой дозы 2,5 мг/кг, 10 мг/кг или 25 мг/кг крысам и определения количества белка С5 (фигура 5В), присутствующего на 7-й день, и активность белка С5 (фигура 5А), присутствующего на дни 4 и 7. Как показано на фигуре 5, присутствует 50% уменьшение активности белка С5 по 4-й день при дозе 25 мг/кг и больше, чем на 70% снижение активности белка С5 в день 7.

Количество белка С5 определяли с помощью вестерн-блоттинга всей сыворотки. Активность белка С5 определяли в реакции гемолиза. Вкратце, фиксированное разведение С5 человека, обедненная сывороткой человека, смешивали с сывороткой мыши и инкубировали с антитело-покрытыми эритроцитами барана в течение 1 часа. Измеряли поглощение гемоглобина и рассчитывали% гемолиза по сравнению с эталонной кривой (полученной с применением серии разведений сыворотки мыши).

Эффективность AD-58642 *in vivo* также анализировали у мышей после однократного подкожного введения 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 25 мг/кг AD-58642. На 5-й день анализировали мРНК С5 в образцах печени с применением qPCR, активность С5 анализировали по гемолизу и количество белка С5 определяли с помощью анализа вестерн-блот всей сыворотки.

Как показано на фигурах 6А и 6В, хотя имеется только незначительное улучшение (т.е. приблизительно 5%) в эффективности AD-58642 ингибировать мРНК С5 при дозе 25 мг/кг по сравнению с 10 мг/кг, в среднем наблюдается 85% сайленсинг при дозе 25 мг/кг. Кроме того, наблюдается эффект доза-ответ при значения  $IC_{50}$  приблизительно 2,5 мг/кг.

На фигурах 7А и 7В , и 8 продемонстрировано, что AD-58642 является эффективным для уменьшения количества белка С5 (фигура 8) и активности белка С5 (7А и 7В) .

Продолжительность сайленсинга AD-58641 *in vivo* определяли путем введения разовой дозы 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг AD-58 641 мышам линии С57В1/6 (количество=3) и определения количества белка С5, присутствующего в этих животных в дни 5 и 9 с помощью анализа ELISA. Вкратце, собирали сыворотку в день 0, предварительно отобранная, и на 5-й день и 9-й день определяли количественно уровни белков С5 с помощью ELISA. Уровни белка С5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке. Как показано на фигуре 9, результаты демонстрируют, что существует дозозависимый эффект и длительный "нокдаун" белка С5 в сыворотке. (Разовая доза ED<sub>50</sub> составляла 0,6 мг/кг) .

Также испытывали соединение AD-58641 на эффективность применения протокола введения нескольких доз на мышах линии С57В1/6. Мышам подкожно вводили соединение AD-58641 в дозе 0,625 мг/кг, 1,25 мг/кг или в дозе 2,5 мг/кг в дни 0, 1, 2, и 3. Сыворотку собирали в дни 0 и 8, как показано на фигуре 10, и анализировали на уровень белка С5 с помощью ELISA. Уровни С5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке. На фигуре 10 показано, что применение нескольких доз AD-58641 приводит к сайленсингу белка С5 при всех тестируемых дозах на уровне больше чем 90% сайленсинга белка С5 при дозе 2,5 мг/кг.

Соединение AD-58641 дополнительно испытывали на эффективность и оценивали кумулятивный эффект соединения на крысах с применением протокола повторного введения. Крысам линии Sprague Dawley дикого типа производили подкожную инъекцию соединения AD-58641 в дозе 2,5 мг/кг/доза или 5,0 мг/кг/доза дважды в неделю в течение 3 недель (q2w x3). Сыворотку собирали на день 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25 и 32. Гемолитическую активность сыворотки измеряли с применением реакции гемолиза, в котором 1:150 разбавление сыворотки крыс инкубировали с



сенсibilизированными клетками крови барана и крысы в GVB++-буфере в течение 1 часа и оценивали количественно высвобождение гемоглобина путем измерения оптической плотности при 415 нм (см. фигура 11а). Количество C5 белка, присутствующего в образцах, также определяли с помощью ELISA (фигура 11В). Полученные результаты демонстрируют дозозависимый эффект и длительное снижение гемолитической активности, достижение приблизительно 90% ингибирования гемолитической активности.

Дополнительные GalNAC-Конъюгированные иРНК С5, Модифицированные Фосфотиоатными связями

ID дуплекса	Смысловая нить	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Начальное положение	Перекрестная Реактивность	PS#
AD-58088.2	A-118324.1	AfuUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	559	A-118325.1	aAfaGfgUfaCfuUfguuGfuUfuAfaAfusCfsu	580	984	HumRheMus	2
AD-58644.1	A-119328.1	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	560	A-119329.1	asAfsaGfgUfaCfuUfguuGfuUfuAfaAfuscsu	581	984	HumRheMus	6
AD-58651.1	A-119328.2	AfsusUfuAfaAfcAfAfCfaAfgUfaCfcUfuUfL96	561	A-119339.1	asAfsaGfsgUfsaCfsuUfsguuGfsuUfsuAfsaAfsusc su	582	984	HumRheMus	14
AD-58099.2	A-118312.1	UfgAfcAfaAfaUfaAfcUfaAfcUfaUfaAfL96	562	A-118313.1	uUfaUfaGfuGfaGfuuaUfuUfuGfuCfasAfsu	583	1513	HumRheMusRat	2

AD- 58641.1	A- 119322.1	UfsgsAfcAfaA faUfAfAfcUfc AfcUfaUfaAfL 96	563	A- 119323.1	usUfsaUfaGfuGf aGfuuaUfuUfuGf uCfasasu	584	1513	HumRheMusRat	6
AD- 58648.1	A- 119322.2	UfsgsAfcAfaA faUfAfAfcUfc AfcUfaUfaAfL 96	564	A- 119336.1	usUfsaUfsaGfsu GfsaGfsuuaUfsu UfsuGfsuCfsasa su	585	1513	HumRheMusRat	14
AD- 58111.2	A- 118316.1	GfaCfaAfaAfu AfAfCfuCfaCf uAfuAfaUfL96	565	A- 118317.1	aUfuAfuAfgUfgA fguuAfuUfuUfgU fcsAfsa	586	1514	HumRheMusRat	2
AD- 58642.1	A- 119324.1	GfsasCfaAfaA fuAfAfCfuCfa CfuAfuAfaUfL 96	566	A- 119325.1	asUfsuAfuAfgUf gAfguuAfuUfuUf gUfcsasa	587	1514	HumRheMusRat	6
AD- 58649.1	A- 119324.2	GfsasCfaAfaA fuAfAfCfuCfa CfuAfuAfaUfL 96	567	A- 119337.1	asUfsuAfsuAfg UfsgAfguuAfsu UfsuUfsgUfscsa sa	588	1514	HumRheMusRat	14
AD- 58116.2	A- 118396.1	GfuUfcCfgGfa UfAfUfuUfgAf aCfuUfuUfL96	568	A- 118397.1	aAfaAfgUfuCfaA fauaUfcCfgGfaA fcsCfsg	589	4502	MusRat	2

AD- 58647.1	A- 119334.1	GfsusUfcCfgG faUfAfUfuUfg AfaCfuUfuUfL 96	569	A- 119335.1	asAfsaAfgUfuCf aAfaUfcCfgGf aAfcscsg	590	4502	MusRat	6
AD- 58654.1	A- 119334.2	GfsusUfcCfgG faUfAfUfuUfg AfaCfuUfuUfL 96	570	A- 119342.1	asAfsaAfsGufsu CfsaAfsauaUfsc CfsgGfsaAfscc sg	591	4502	MusRat	14
AD- 58121.2	A- 118382.1	UfgCfaGfaUfc AfAfAfcAfcAf aUfuUfcAfL96	571	A- 118383.1	uGfaAfaUfuGfuG fuuuGfaUfcUfgC fasGfsa	592	4945	MusRat	2
AD- 58645.1	A- 119330.1	UfsgsCfaGfaU fcAfAfAfcAfc AfaUfuUfcAfL 96	572	A- 119331.1	usGfsaAfaUfuGf uGfuuuGfaUfcUf gCfasgsa	593	4945	MusRat	6
AD- 58652.1	A- 119330.2	UfsgsCfaGfaU fcAfAfAfcAfc AfaUfuUfcAfL 96	573	A- 119340.1	usGfsaAfsaUfsu GfsuGfsuuuGfsa UfscUfsgCfsasg sa	594	4945	MusRat	14
AD- 58123.2	A- 118320.1	AfaGfcAfaGfa UfAfUfuUfuUf aUfaAfuAfL96	574	A- 118321.1	uAfuUfaUfaAfaA faUfcUfuGfcU fusUfsu	595	786	HumRheMus	2

AD- 58643.1	A- 119326.1	AfsasGfcAfaG faUfAfUfuUfu UfaUfaAfuAfL 96	575	A- 119327.1	usAfsuUfaUfaAf aAfaUfcUfuGf cUfususu	596	786	HumRheMus	6
AD- 58650.1	A- 119326.2	AfsasGfcAfaG faUfAfUfuUfu UfaUfaAfuAfL 96	576	A- 119338.1	usAfsuUfsaUfsa AfsaAfsauaUfsc UfsuGfscUfsusu su	597	786	HumRheMus	14
AD- 58133.2	A- 118386.1	CfaGfaUfcAfa AfCfAfcAfaUf uUfcAfgUfL96	577	A- 118387.1	aCfuGfaAfaUfuG fuguUfuGfaUfcU fgsCfsa	598	4947	MusRat	2
AD- 58646.1	A- 119332.1	CfsasGfaUfcA faAfCfAfcAfa UfuUfcAfgUfL 96	578	A- 119333.1	asCfsuGfaAfaUf uGfuguUfuGfaUf cUfgscsa	599	4947	MusRat	6
AD- 58653.1	A- 119332.2	CfsasGfaUfcA faAfCfAfcAfa UfuUfcAfgUfL 96	579	A- 119341.1	asCfsuGfsaAfsa UfsuGfsuguUfsu GfsaUfscUfsgsc sa	600	4947	MusRat	14

#### Пример 4: Конструирование, Синтез и Скрининг Дополнительных siRNA *in Vitro*

##### *Конструирование siRNA*

Дуплексы С5 длиной 19 нуклеотидов как для смысловой, так и антисмысловой цепи конструировали с применением последовательности мРНК С5 человека, представленной в GenBank, № NM\_001735.2. Первоначально определили пятьсот шестьдесят девять дуплексов, не содержащих повторы длиннее, чем 7 нуклеотидов, охватывая по существу весь 5480-нуклеотидный транскрипт. Все 569 дуплексов затем оценивали на предсказанную эффективность в соответствии с линейной моделью, которая оценивает пары нуклеотидов в каждом положении дуплекса, а доза и клеточная линия применяют для скрининга. Дуплексы также сопоставляли со всеми транскриптами в коллекции RefSeq человека, используя собственный алгоритм полного перебора, и считали наименьшие значения несовпадений (на цепь) к транскриптам, отличным от С5. Дуплексы синтезировали и подвергали скринингу, а затем выбирали из 569, в соответствии со следующей схемой: Начиная с 5'конца транскрипта, дуплекс выбирали внутри "окна" каждые  $10 \pm 2$  нуклеотидов, которые

- 1) имели самую высокую предсказанную эффективность,
- 2) имели по меньшей мере одно несовпадение в обеих цепях ко всем транскриптам, отличным от SERPINC1,
- 3) еще не были синтезированы и не подвергались скринингу как часть других наборов дуплексов.

Если в данном окне не был идентифицирован дуплекс, который удовлетворял всем критериям, то окно пропускали.

Подробный список из 569 последовательностей смысловой и антисмысловой цепи С5 показан в таблице 20.

Эффективность *in vitro* дуплексов, содержащих смысловую и антисмысловую последовательности, приведенные в таблице 20, определяли с помощью следующих способов.

##### *Клеточная культура и трансфекции*

Клетки НерG2 (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали

практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной поддерживающей среде Игла (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8  $\mu$ л Opti-MEM с 0,2  $\mu$ л Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5  $\mu$ л каждого из 164 дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. 80  $\mu$ л полных питательных сред без антибиотика, содержащих  $\sim 2,5 \times 10^4$  клеток HepG2, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты выполняли при значении 20 нМ и включали наивные клетки и клетки, трансфицированные AD-1955, люцифераза-нацеленная siRNA в качестве отрицательного контроля.

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

Клетки собирали и лизировали в 150  $\mu$ л лизирующего/связывающего буфера, затем смешивали в течение 5 минут при 700 об./мин. на качалке с платформой (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80  $\mu$ л смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 минуты. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение 5 минут. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150  $\mu$ л промывочного буфера А и смешивали в течение 1 минуты. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150  $\mu$ л промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150  $\mu$ л буфера элюирования В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 минут. После высыхания добавляли 50  $\mu$ л элюирующего буфера

и смешивали в течение 5 минут при 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 минут. Удаляли сорок  $\mu$ л супернатанта, содержащего выделенную РНК, и добавляли в другой 96-луночный планшет.

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

Мастер-микс из 2  $\mu$ л 10X буфера, 0,8  $\mu$ л 25X dNTP, 2  $\mu$ л случайных праймеров, 1  $\mu$ л обратной транскриптазы, 1  $\mu$ л ингибитора РНКазы и 3,2  $\mu$ л H<sub>2</sub>O на реакцию добавляли в 10  $\mu$ л общей РНК. кДНК получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C 10 мин., 37°C 120 мин., 85°C 5 с, хранение при 4°C.

*PCR в режиме реального времени*

Два мкл кДНК добавляли к смеси мастер-микса, содержащей 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (Applied Biosystems, номер по каталогу 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для SERPINC1 человека (Applied Biosystems, номер по каталогу Hs00892758\_m1) и 5 мкл зонда мастер-микс Lightcycler 480 (Roche, номер по каталогу 04887301001) в каждую лунку 384-луночного планшета (Roche, номер по каталогу 04887301001). PCR в режиме реального времени проводили в приборе LC480 Real Time PCR (Roche).

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением  $\Delta\Delta$ Ct-способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 20нМ AD-1955.



Дополнительные последовательности немодифицированной си антисмысловой Цепи С5

Название олигонуклеотида	Положение в NM_001735.2	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
NM_001735.2_3-21_s	3-21	UAUCCGUGGUUCCUGCUA	601	UAGCAGGAAACCACGGAUA	1170
NM_001735.2_10-28_s	10-28	GGUUUCCUGCUACCUCCAA	602	UUGGAGGUAGCAGGAAACC	1171
NM_001735.2_22-40_s	22-40	CCUCCAACCAUGGGCCUUU	603	AAAGGCCCAUGGUUGGAGG	1172
NM_001735.2_33-51_s	33-51	GGGCCUUUUGGAAUACUU	604	AAGUAUUCCTAAAAGGCC	1173
NM_001735.2_43-61_s	43-61	GGAAUACUUUGUUUUUAA	605	UUAAAAACAAGUAUUC	1174
NM_001735.2_49-67_s	49-67	CUUUGUUUUUAAUCUCC	606	GGAAGAUUAAAAACAAG	1175
NM_001735.2_63-81_s	63-81	CUUCCUGGGGAAAACCUGG	607	CCAGGUUUUCCCCAGGAAG	1176
NM_001735.2_71-89_s	71-89	GGAAAACCUGGGGACAGGA	608	UCCUGUCCCCAGGUUUUC	1177
NM_001735.2_81-99_s	81-99	GGGACAGGAGCAAACAUAU	609	AUAUGUUUGCUCUCCUGUCC	1178

NM_001735.2_91-109_s	91-109	CAAACAU AUGUCAUUUCAG	610	CUGAAAUGACAU AUGUUUG	1179
NM_001735.2_102-120_s	102-120	CAUUUCAGCACCAAAAUA	611	UAUUUUUGGUGCUGAAAUG	1180
NM_001735.2_109-127_s	109-127	GCACCAAAAUAUUCGGUG	612	CACGGAAUAUUUUUGGUGC	1181
NM_001735.2_123-141_s	123-141	CCGUGUUGGAGCAUCUGAA	613	UUCAGAUGCUGCAACACGG	1182
NM_001735.2_130-148_s	130-148	GGAGCAUCUGAAAUAUUG	614	CAAUAUUUUCAGAUGCUC	1183
NM_001735.2_139-157_s	139-157	GAAAUAUUGUGAUUCAAG	615	CUUGAAUCACAAUAUUUUC	1184
NM_001735.2_150-168_s	150-168	GAUUCAAGUUUAUGGAUAC	616	GUAUCCAUA AACUUGAAUC	1185
NM_001735.2_163-181_s	163-181	GGAUACACUGAAGCAUUUG	617	CAAUGCUUCAGUGUAUCC	1186
NM_001735.2_172-190_s	172-190	GAAGCAUUUGAUGCAACAA	618	UUGUUGCAUCAAAUGCUUC	1187
NM_001735.2_183-201_s	183-201	UGCAACAAUCUCUAUUAAA	619	UUUAAUAGAGAUUGUUGCA	1188
NM_001735.2_189-207_s	189-207	AAUCUCUAUUAAAAGUUUAU	620	AUAACUUUUAUAGAGAUU	1189
NM_001735.2_201-219_s	201-219	AAGUUAUCCUGAUAAAAAA	621	UUUUUUAUCAGGAUAACUU	1190

NM_001735.2_209-227_s	209-227	CUGAUAAAAAUUUAGUUA	622	UAACUAAAUUUUUAUCAG	1191
NM_001735.2_221-239_s	221-239	UUAGUUACUCCUCAGGCCA	623	UGGCCUGAGGAGUAACUAA	1192
NM_001735.2_230-248_s	230-248	CCUCAGGCCAUGUUCAUUU	624	AAAUGAACAUGGCCUGAGG	1193
NM_001735.2_242-260_s	242-260	UUCAUUUAUCCUCAGAGAA	625	UUCUCUGAGGAUAAAUGAA	1194
NM_001735.2_252-270_s	252-270	CUCAGAGAAUAAAUCCAA	626	UUGGAAUUUAUUCUCUGAG	1195
NM_001735.2_259-277_s	259-277	AAUAAAUCCAAAACUCUG	627	CAGAGUUUUGGAAUUUAUU	1196
NM_001735.2_273-291_s	273-291	CUCUGCAAUCUUAACAAUA	628	UAUUGUUAAGAUUGCAGAG	1197
NM_001735.2_282-300_s	282-300	CUUAACAAUACAACCAAAA	629	UUUUGGUUGUAUUGUUAAG	1198
NM_001735.2_292-310_s	292-310	CAACCAAACAAUUGCCUG	630	CAGGCAAUUGUUUUGGUUG	1199
NM_001735.2_301-319_s	301-319	CAAUUGCCUGGAGGACAAA	631	UUUGUCCUCCAGGCAAUUG	1200
NM_001735.2_313-331_s	313-331	GGACAAAACCCAGUUUCUU	632	AAGAAACUGGGUUUUGUCC	1201
NM_001735.2_322-340_s	322-340	CCAGUUUCUUAUGUGUAUU	633	AAUACACAUAAAGAAACUGG	1202

NM_001735.2_332-350_s	332-350	AUGUGUAUUUGGAAGUUGU	634	ACAACUCCAAAUACACAU	1203
NM_001735.2_342-360_s	342-360	GGAAGUUGUAUCAAGCAU	635	AUGCUUUGAUACAACUCC	1204
NM_001735.2_349-367_s	349-367	GUAUCAAGCAUUUUUCA	636	UUGAAAAAUGCUUUGAUAC	1205
NM_001735.2_361-379_s	361-379	UUUUCAAAUCAAAAGAA	637	UUCUUUUUGAUUUUGAAAA	1206
NM_001735.2_371-389_s	371-389	CAAAAAGAAUGCCAAUAC	638	GUUAUUGGCAUUCUUUUUG	1207
NM_001735.2_381-399_s	381-399	GCCAAUAACCUAUGACAAU	639	AUUGUCAUAGGUUAUUGGC	1208
NM_001735.2_389-407_s	389-407	CCUAUGACAAUGGAUUUCU	640	AGAAAUCCAUGUCAUAGG	1209
NM_001735.2_399-417_s	399-417	UGGAUUUCUCUUCAUUCAU	641	AUGAAUGAAGAGAAAUCCA	1210
NM_001735.2_411-429_s	411-429	CAUUCAUACAGACAAACCU	642	AGGUUUGUCUGUAUGAAUG	1211
NM_001735.2_419-437_s	419-437	CAGACAAACCGUUUAUAC	643	GUUAUAAACAGGUUUGUCUG	1212
NM_001735.2_430-448_s	430-448	GUUUUAUCUCCAGACCAGU	644	ACUGGUCUGGAGUAUAAAC	1213
NM_001735.2_441-459_s	441-459	AGACCAGUCAGUAAAAGUU	645	AACUUUUACUGACUGGUCU	1214

NM_001735.2_450-468_s	450-468	AGUAAAAGUUAGAGUUUUAU	646	AUAAACUCUAACUUUUACU	1215
NM_001735.2_460-478_s	460-478	AGAGUUUAUUCGUUGAAUG	647	CAUUCAACGAAUAAACUCU	1216
NM_001735.2_470-488_s	470-488	CGUUGAAUGACGACUUGAA	648	UUCAAGUCGUCAUUCAACG	1217
NM_001735.2_483-501_s	483-501	CUUGAAGCCAGCCAAAAGA	649	UCUUUUGGCUGGCUUCAAG	1218
NM_001735.2_490-508_s	490-508	CCAGCCAAAAGAGAAACUG	650	CAGUUUCUCUUUUGGCUGG	1219
NM_001735.2_503-521_s	503-521	AAACUGUCUUAACUUUCAU	651	AUGAAAGUUAAGACAGUUU	1220
NM_001735.2_513-531_s	513-531	AACUUUCAUAGAUCUGAA	652	UUCAGGAUCUAUGAAAGUU	1221
NM_001735.2_519-537_s	519-537	CAUAGAUCUGAAGGAUCA	653	UGAUCCUUCAGGAUCUAUG	1222
NM_001735.2_529-547_s	529-547	GAAGGAUCAGAAGUUGACA	654	UGUCAACUUCUGAUCCUUC	1223
NM_001735.2_543-561_s	543-561	UGACAUGGUAGAAGAAAUU	655	AAUUUCUUCUACCAUGUCA	1224
NM_001735.2_553-571_s	553-571	GAAGAAUUGAUCAUAUUG	656	CAAUAUGAUCAAUUUCUUC	1225
NM_001735.2_562-580_s	562-580	GAUCAUAUUGGAAUUAUCU	657	AGAUAAUCCAAUAUGAUC	1226

NM_001735.2_571-589_s	571-589	GGAAUUAUCUCUUUCCUG	658	CAGGAAAAGAGAUAAUCC	1227
NM_001735.2_579-597_s	579-597	CUCUUUCCUGACUUCAAG	659	CUUGAAGUCAGGAAAAGAG	1228
NM_001735.2_590-608_s	590-608	ACUUCAAGAUUCCGUCUAA	660	UUAGACGGAAUCUUGAAGU	1229
NM_001735.2_601-619_s	601-619	CCGUCUAAUCCUAGAU AUG	661	CAUAUCUAGGAUUAGACGG	1230
NM_001735.2_610-628_s	610-628	CCUAGAU AUGGUAUGUGGA	662	UCCACAUACCAUAUCUAGG	1231
NM_001735.2_623-641_s	623-641	UGUGGACGAUCAAGGCUAA	663	UUAGCCUUGAUCGUCCACA	1232
NM_001735.2_629-647_s	629-647	CGAUCAAGGCUAAAUAUAA	664	UUAUAUUUAGCCUUGAUCG	1233
NM_001735.2_642-660_s	642-660	AUAUAAAAGAGGACUUUUCA	665	UGAAAAGUCCUCUUUAUUAU	1234
NM_001735.2_649-667_s	649-667	GAGGACUUUUCAACAACUG	666	CAGUUGUUGAAAAGUCCUC	1235
NM_001735.2_662-680_s	662-680	CAACUGGAACCGCAUAUUU	667	AAUAUGCGGUUCCAGUUG	1236
NM_001735.2_672-690_s	672-690	CGCAUAUUUUGAAGUUAAA	668	UUUAACUUCAAAUAUGCG	1237
NM_001735.2_683-701_s	683-701	AAGUUAAGAAUAUGUCUU	669	AAGACAUAUUCUUUAACUU	1238

NM_001735.2_691-709_s	691-709	GAAUAUGUCUUGCCACAUU	670	AAUGUGGCAAGACAUAUUC	1239
NM_001735.2_703-721_s	703-721	CCACAUUUUUCUGUCUCAA	671	UUGAGACAGAAAAAUGUGG	1240
NM_001735.2_713-731_s	713-731	CUGUCUCAAUCGAGCCAGA	672	UCUGGCUCGAUUGAGACAG	1241
NM_001735.2_719-737_s	719-737	CAAUCGAGCCAGAAUAUAA	673	UUAUAUUCUGGCUCGAUUG	1242
NM_001735.2_730-748_s	730-748	GAAUAUAUUUCAUUGGUU	674	AACCAAUGAAAUUAUAUUC	1243
NM_001735.2_742-760_s	742-760	AUUGGUUACAAGAACUUUA	675	UAAAGUUCUUGUAACCAAU	1244
NM_001735.2_752-770_s	752-770	AGAACUUUAAGAAUUUUGA	676	UCAAAAUUCUUAAGUUCU	1245
NM_001735.2_762-780_s	762-780	GAAUUUUGAAAUAUAUAUA	677	UAUAGUAAUUUCAAAAUUC	1246
NM_001735.2_769-787_s	769-787	GAAAUUACUAUAAAAGCAA	678	UUGCUIUUUAUAGUAAUUUC	1247
NM_001735.2_781-799_s	781-799	AAAGCAAGAUUUUUUAUA	679	UAUAAAAUAUCUUGCUIUU	1248
NM_001735.2_789-807_s	789-807	AUAUUUUUAUAUAAAAGUA	680	UACUUUAUUAUAAAAUAU	1249
NM_001735.2_803-821_s	803-821	AAGUAGUCACUGAGGCUGA	681	UCAGCCUCAGUGACUACUU	1250

NM_001735.2_810-828_s	810-828	CACUGAGGCUGACGUUUAU	682	AUAAACGUCAGCCUCAGUG	1251
NM_001735.2_822-840_s	822-840	CGUUUAUAUCACAUUUGGA	683	UCCAAAUGUGAUUAAAACG	1252
NM_001735.2_831-849_s	831-849	CACAUUUGGAAUAAGAGAA	684	UUCUCUUAUCCAAAUGUG	1253
NM_001735.2_840-858_s	840-858	AAUAAGAGAAGACUAAAA	685	UUUUAAGUCUUCUCUUAUU	1254
NM_001735.2_852-870_s	852-870	CUUAAAAGAUGAUCAAAA	686	UUUUUGAUCAUUUUUAAG	1255
NM_001735.2_859-877_s	859-877	GAUGAUCAAAAGAAAUGA	687	UCAUUUCUUUUUGAUCauc	1256
NM_001735.2_872-890_s	872-890	AAAUGAUGCAAACAGCAAU	688	AUUGCUGUUUGCAUCAUUU	1257
NM_001735.2_883-901_s	883-901	ACAGCAAUGCAAAACACAA	689	UUGUGUUUUGCAUUGCUGU	1258
NM_001735.2_893-911_s	893-911	AAAACACAAUGUUGAUAAA	690	UUUAUCAACAUUGUGUUUU	1259
NM_001735.2_899-917_s	899-917	CAAUGUUGAUAAAUGGAAU	691	AUCCAUUUAUCAACAUUG	1260
NM_001735.2_913-931_s	913-931	GGAAUUGCUCUAGUCACAU	692	AUGUGACUUGAGCAAUCC	1261
NM_001735.2_919-937_s	919-937	GCUCAAGUCACAUUUGAUU	693	AAUCAAAUGUGACUUGAGC	1262



NM_001735.2_930-948_s	930-948	AUUUGAUUCUGAAACAGCA	694	UGCUGUUUCAGAAUCAAU	1263
NM_001735.2_939-957_s	939-957	UGAAACAGCAGUCAAGAA	695	UUCUUUGACUGCUGUUUCA	1264
NM_001735.2_951-969_s	951-969	CAAAGAACUGUCAUACUAC	696	GUAGUAUGACAGUUCUUUG	1265
NM_001735.2_962-980_s	962-980	CAUACUACAGUUUAGAAGA	697	UCUUCUAAACUGUAGUAUG	1266
NM_001735.2_969-987_s	969-987	CAGUUUAGAAGAUUUAAAC	698	GUUUAAAUCUUCUAAACUG	1267
NM_001735.2_983-1001_s	983-1001	UAAACAACAAGUACCUUUA	699	UAAAGGUACUUGUUGUUUA	1268
NM_001735.2_990-1008_s	990-1008	CAAGUACCUUUUAUUAUUGCU	700	AGCAAUAUAAAGGUACUUG	1269
NM_001735.2_1002-1020_s	1002-1020	UAUUGCUGUAAACAGUCAUA	701	UAUGACUGUUACAGCAAUA	1270
NM_001735.2_1011-1029_s	1011-1029	AACAGUCAUAGAGUCUACA	702	UGUAGACUCUAUGACUGUU	1271
NM_001735.2_1020-1038_s	1020-1038	AGAGUCUACAGGUGGAUUU	703	AAAUCCACCUGUAGACUCU	1272
NM_001735.2_1033-1051_s	1033-1051	GGAUUUUCUGAAGAGGCAG	704	CUGCCUCUUCAGAAAUCC	1273
NM_001735.2_1042-1060_s	1042-1060	GAAGAGGCAGAAAUACCG	705	CAGGUAUUUCUGCCUCUUC	1274

NM_001735.2_1050-1068_s	1050-1068	AGAAAUACCUUGGCAUCAA	706	UUUGAUGCCAGGUUUUCU	1275
NM_001735.2_1061-1079_s	1061-1079	GCAUCAAAUAUGUCCUCUC	707	GAGAGGACAUUUUGAUGC	1276
NM_001735.2_1071-1089_s	1071-1089	UGUCCUCUCUCCCUACAAA	708	UUUGUAGGGAGAGAGGACA	1277
NM_001735.2_1092-1110_s	1092-1110	GAAUUUGGUUGCUACUCCU	709	AGGAGUAGCAACCAAUUC	1278
NM_001735.2_1102-1120_s	1102-1120	GCUACUCCUCUUUCCUGA	710	UCAGGAAAAGAGGAGUAGC	1279
NM_001735.2_1109-1127_s	1109-1127	CUCUUUCCUGAAGCCUGG	711	CCAGGCUUCAGGAAAAGAG	1280
NM_001735.2_1123-1141_s	1123-1141	CCUGGGAUUCCAUAUCCCA	712	UGGGAUAUGGAAUCCAGG	1281
NM_001735.2_1133-1151_s	1133-1151	CAUAUCCCAUCAAGGUGCA	713	UGCACCUUGAUGGGUAUUG	1282
NM_001735.2_1139-1157_s	1139-1157	CCAUCAAGGUGCAGGUUAA	714	UUAACCUGCACCUUGAUGG	1283
NM_001735.2_1150-1168_s	1150-1168	CAGGUUAAAGAUUCGCUUG	715	CAAGCGAAUCUUUAACCUG	1284
NM_001735.2_1161-1179_s	1161-1179	UUCGCUUGACCAGUUGGUA	716	UACCAACUGGUCAAGCGAA	1285
NM_001735.2_1170-1188_s	1170-1188	CCAGUUGGUAGGAGGAGUC	717	GACUCCUCCUACCAACUGG	1286

NM_001735.2_1180-1198_s	1180-1198	GGAGGAGUCCCAGUAACAC	718	GUGUUACUGGGACUCCUCC	1287
NM_001735.2_1190-1208_s	1190-1208	CAGUAACACUGAAUGCACA	719	UGUGCAUUCAGUGUUACUG	1288
NM_001735.2_1200-1218_s	1200-1218	GAAUGCACAAACAAUUGAU	720	AUCAAUUGUUUGUGCAUUC	1289
NM_001735.2_1209-1227_s	1209-1227	AACAAUUGAUGUAAACCAA	721	UUGGUUUACAUCAAUUGUU	1290
NM_001735.2_1220-1238_s	1220-1238	UAAACCAAGAGACAUCUGA	722	UCAGAUGUCUCUUGGUUUA	1291
NM_001735.2_1232-1250_s	1232-1250	CAUCUGACUUGGAUCCAAG	723	CUUGGAUCCAAGUCAGAUG	1292
NM_001735.2_1243-1261_s	1243-1261	GAUCCAAGCAAAGUGUAA	724	UUACACUUUUGCUUGGAUC	1293
NM_001735.2_1251-1269_s	1251-1269	CAAAGUGUAACACGUGUU	725	AACACGUGUUACACUUUUG	1294
NM_001735.2_1260-1278_s	1260-1278	AACACGUGUUGAUGAUGGA	726	UCCAUCAUCAACACGUGUU	1295
NM_001735.2_1272-1290_s	1272-1290	UGAUGGAGUAGCUUCCUUU	727	AAAGGAAGCUACUCCAUCA	1296
NM_001735.2_1279-1297_s	1279-1297	GUAGCUUCCUUUGUGCUUA	728	UAAGCACAAAGGAAGCUAC	1297
NM_001735.2_1293-1311_s	1293-1311	GCUUAAUCUCCCAUCUGGA	729	UCCAGAUGGGAGAUUAAGC	1298

NM_001735.2_1303-1321_s	1303-1321	CCAUCUGGAGUGACGGUGC	730	GCACCGUCACUCCAGAUGG	1299
NM_001735.2_1313-1331_s	1313-1331	UGACGGUGCUGGAGUUUAA	731	UUA AACUCCAGCACCGUCA	1300
NM_001735.2_1320-1338_s	1320-1338	GCUGGAGUUUAAUGUCAAA	732	UUUGACAUUAAACUCCAGC	1301
NM_001735.2_1332-1350_s	1332-1350	UGUCAAAACUGAUGCUGCA	733	UGGAGCAUCAGUUUUGACA	1302
NM_001735.2_1342-1360_s	1342-1360	GAUGCUGCCAGAUCUCCAG	734	CUGGAAGAUCUGGAGCAUC	1303
NM_001735.2_1349-1367_s	1349-1367	CAGAUCUCCAGAAGAAAA	735	UUUUCUUCUGGAAGAUCUG	1304
NM_001735.2_1362-1380_s	1362-1380	AGAAAAUCAGGCCAGGGAA	736	UUCCCUGGCCUGAUUUUCU	1305
NM_001735.2_1371-1389_s	1371-1389	GGCCAGGGAAGGUUACCGA	737	UCGGUAACCUUCCCUGGCC	1306
NM_001735.2_1382-1400_s	1382-1400	GUUACCGAGCAAUAGCAUA	738	UAUGCUAUUGCUCGGUAAC	1307
NM_001735.2_1393-1411_s	1393-1411	AUAGCAUACUCAUCUCUCA	739	UGAGAGAUGAGUAUGCUAU	1308
NM_001735.2_1399-1417_s	1399-1471	UACUCAUCUCUCAGCCAAA	740	UUUGGCUGAGAGAUGAGUA	1309
NM_001735.2_1412-1430_s	1412-1430	GCCAAAGUUACCUUUUAUUAU	741	AUAUAAAGGUAACUUUGGC	1310

NM_001735.2_1422-1440_s	1422-1440	CCUUUAUAUUGAUUGGACU	742	AGUCCAAUCAUAUAAAAGG	1311
NM_001735.2_1432-1450_s	1432-1450	GAUUGGACUGAUAACCAUA	743	UAUGGUUAUCAGUCCAAUC	1312
NM_001735.2_1439-1457_s	1439-1457	CUGAUAACCAUAAGGCUUU	744	AAAGCCUUAUGGUUAUCAG	1313
NM_001735.2_1451-1469_s	1451-1469	AGGCUUUGCUAGUGGGAGA	745	UCUCCCACUAGCAAAGCCU	1314
NM_001735.2_1462-1480_s	1462-1480	GUGGGAGAACAUCUGAAUA	746	UAUUCAGAUGUUCUCCCAC	1315
NM_001735.2_1471-1489_s	1471-1489	CAUCUGAAUAUUAUUGUUA	747	UAACAAUAAUAUUCAGAUG	1316
NM_001735.2_1479-1497_s	1479-1497	UAUUAUUGUUACCCCAA	748	UUUGGGGGUAACAAUAAUA	1317
NM_001735.2_1492-1510_s	1492-1510	CCCAAAGCCCAUAUAUUG	749	CAAUAUAUGGGCUUUUGG	1318
NM_001735.2_1493-1511_s	1493-1511	CCAAAAGCCCAUAUAUUGA	750	UCAUAUAUGGGCUUUUGG	1319
NM_001735.2_1494-1512_s	1494-1512	CAAAGCCCAUAUAUUGAC	751	GUCAUAUAUGGGCUUUUG	1320
NM_001735.2_1495-1513_s	1495-1513	AAAAGCCCAUAUAUUGACA	752	UGUCAUAUAUGGGCUUUU	1321
NM_001735.2_1496-1514_s	1496-1514	AAAGCCCAUAUAUUGACAA	753	UUGUCAUAUAUGGGCUUU	1322

NM_001735.2_1497-1515_s	1497-1515	AAGCCCAUUAUUGACAAA	754	UUUGUCAAUUAUGGGCUU	1323
NM_001735.2_1498-1516_s	1498-1516	AGCCCAUUAUUGACAAAA	755	UUUUGUCAAUUAUGGGCU	1324
NM_001735.2_1499-1517_s	1499-1517	GCCCAUUAUUGACAAAAU	756	AUUUUGUCAAUUAUGGGC	1325
NM_001735.2_1500-1518_s	1500-1518	CCCAUUAUUGACAAAAUA	757	UAUUUUGUCAAUUAUGGG	1326
NM_001735.2_1501-1519_s	1501-1519	CCAUAUAUUGACAAAAUAA	758	UUAUUUUGUCAAUUAUGG	1327
NM_001735.2_1502-1520_s	1502-1520	CAUAUAUUGACAAAAUAAC	759	GUUAUUUUGUCAAUUAUG	1328
NM_001735.2_1503-1521_s	1503-1521	AUAUAUUGACAAAAUAACU	760	AGUUAUUUUGUCAAUUAU	1329
NM_001735.2_1504-1522_s	1504-1522	UAUAUUGACAAAAUAACUC	761	GAGUUAUUUUGUCAAUUA	1330
NM_001735.2_1505-1523_s	1505-1523	AUAUUGACAAAAUAACUCA	762	UGAGUUAUUUUGUCAAUU	1331
NM_001735.2_1506-1524_s	1506-1524	UAUUGACAAAAUAACUCAC	763	GUGAGUUAUUUUGUCAUA	1332
NM_001735.2_1507-1525_s	1507-1525	AUUGACAAAAUAACUCACU	764	AGUGAGUUAUUUUGUCAU	1333
NM_001735.2_1508-1526_s	1508-1526	UUGACAAAAUAACUCACUA	765	UAGUGAGUUAUUUUGUCA	1334

NM_001735.2_1509-1527_s	1509-1527	UGACAAAUAACUCACUAU	766	AUAGUGAGUUAUUUUGUCA	1335
NM_001735.2_1510-1528_s	1510-1528	GACAAAUAACUCACUAUA	767	UAUAGUGAGUUAUUUUGUC	1336
NM_001735.2_1513-1531_s	1513-1531	AAAUAACUCACUAUAAU	768	AAUUAUAGUGAGUUAUUU	1337
NM_001735.2_1514-1532_s	1514-1532	AAUAACUCACUAUAAUUA	769	UAAUUAUAGUGAGUUAUU	1338
NM_001735.2_1515-1533_s	1515-1533	AAUAACUCACUAUAAUUAC	770	GUAUUUAUAGUGAGUUAUU	1339
NM_001735.2_1516-1534_s	1516-1534	AUAACUCACUAUAAUUACU	771	AGUAAUUUAUAGUGAGUUAU	1340
NM_001735.2_1518-1536_s	1518-1536	AACUCACUAUAAUUACUUG	772	CAAGUAAUUUAUAGUGAGUU	1341
NM_001735.2_1519-1537_s	1519-1537	ACUCACUAUAAUUACUUGA	773	UCAAGUAAUUUAUAGUGAGU	1342
NM_001735.2_1520-1538_s	1520-1538	CUCACUAUAAUUACUUGAU	774	AUCAAGUAAUUUAUAGUGAG	1343
NM_001735.2_1521-1539_s	1521-1539	UCACUAUAAUUACUUGAUU	775	AAUCAAGUAAUUUAUAGUGA	1344
NM_001735.2_1523-1541_s	1523-1541	ACUAUAAUUACUUGAUUUU	776	AAAUCAAGUAAUUUAUAGU	1345
NM_001735.2_1524-1542_s	1524-1542	CUAUAAUUACUUGAUUUUA	777	UAAAAUCAAGUAAUUUAUAG	1346

NM_001735.2_1525-1543_s	1525-1543	UAUAAUACUUGAUUUUUAU	778	AUAAAUCAAGUAAUUAUA	1347
NM_001735.2_1526-1544_s	1526-1544	AUAAUACUUGAUUUUAUC	779	GAUAAAUCAAGUAAUUAU	1348
NM_001735.2_1527-1545_s	1527-1545	UAAUUACUUGAUUUUAUCC	780	GGAUAAAUCAAGUAAUUA	1349
NM_001735.2_1528-1546_s	1528-1546	AAUUACUUGAUUUUAUCCA	781	UGGAUAAAUCAAGUAAUU	1350
NM_001735.2_1529-1547_s	1529-1547	AUUACUUGAUUUUAUCCAA	782	UUGGAUAAAUCAAGUAAU	1351
NM_001735.2_1540-1558_s	1540-1558	UUAUCCAAGGGCAAAAUUA	783	UAAUUUUGCCCUUGGAUAA	1352
NM_001735.2_1550-1568_s	1550-1568	GCAAAAUUAUCCACUUUGG	784	CCAAAGUGGAUAAUUUUGC	1353
NM_001735.2_1561-1579_s	1561-1579	CACUUUGGCACGAGGGAGA	785	UCUCCCUCGUGCCAAAGUG	1354
NM_001735.2_1571-1589_s	1571-1589	CGAGGGAGAAAUUUUCAGA	786	UCUGAAAUUUCUCCCUCG	1355
NM_001735.2_1581-1599_s	1581-1599	AUUUUCAGAUGCAUCUUUAU	787	AUAAGAUGCAUCUGAAAAU	1356
NM_001735.2_1591-1609_s	1591-1609	GCAUCUUAUCAAGUAUAA	788	UUAUACUUGAUAAGAUGC	1357
NM_001735.2_1600-1618_s	1600-1618	CAAAGUAUAAACAUUCCAG	789	CUGGAAUGUUUAUACUUUG	1358



NM_001735.2_1612-1630_s	1612-1630	AUUCCAGU AACACAGAACA	790	UGUUCUGUGUUACUGGAAU	1359
NM_001735.2_1622-1640_s	1622-1640	CACAGAACAUGGUUCCUUC	791	GAAGGAACCAUGUUCUGUG	1360
NM_001735.2_1632-1650_s	1632-1560	GGUUCUUAUCCCGACUU	792	AAGUCGGGAUGAAGGAACC	1361
NM_001735.2_1643-1661_s	1643-1661	CCCGACUUCUGGUCUAUUA	793	UAAUAGACCAGAAGUCGGG	1362
NM_001735.2_1653-1671_s	1653-1671	GGUCUAUUACAUCGUCACA	794	UGUGACGAUGUAAUAGACC	1363
NM_001735.2_1663-1681_s	1663-1681	AUCGUCACAGGAGAACAGA	795	UCUGUUCUCCUGUGACGAU	1364
NM_001735.2_1670-1688_s	1670-1688	CAGGAGAACAGACAGCAGA	796	UCUGCUGUCUGUUCUCCUG	1365
NM_001735.2_1682-1700_s	1682-1700	CAGCAGAAUUAGUGUCUGA	797	UCAGACACUAAUUCUGCUG	1366
NM_001735.2_1693-1711_s	1693-1711	GUGUCUGAUUCAGUCUGGU	798	ACCAGACUGAAUCAGACAC	1367
NM_001735.2_1703-1721_s	1703-1721	CAGUCUGGUUAAAUAUUGA	799	UCAAUUUUAACCAGACUG	1368
NM_001735.2_1710-1728_s	1710-1728	GUUAAAUAUUGAAGAAAA	800	UUUUUCUCAAUAUUU AAC	1369
NM_001735.2_1722-1740_s	1722-1740	AGAAAAAUGUGGCAACCAG	801	CUGGUUGCCACAUUUUUCU	1370

NM_001735.2_1733-1751_s	1733-1751	GCAACCAGCUCCAGGUUCA	802	UGAACCUGGAGCUGGUUGC	1371
NM_001735.2_1740-1758_s	1740-1758	GCUCCAGGUUCAUCUGUCU	803	AGACAGAUGAACCUGGAGC	1372
NM_001735.2_1751-1769_s	1751-1769	AUCUGUCUCCUGAUGCAGA	804	UCUGCAUCAGGAGACAGAU	1373
NM_001735.2_1762-1780_s	1762-1780	GAUGCAGAUGCAUAUUCUC	805	GAGAAUAUGCAUCUGCAUC	1374
NM_001735.2_1771-1789_s	1771-1789	GCAUAUUCUCCAGGCCAAA	806	UUUGGCCUGGAGAAUAUGC	1375
NM_001735.2_1782-1800_s	1782-1800	AGGCCAAACUGUGUCUCUU	807	AAGAGACACAGUUUGGCCU	1376
NM_001735.2_1792-1810_s	1792-1810	GUGUCUCUUAUAUUGGCAA	808	UUGCCAUAUUAAGAGACAC	1377
NM_001735.2_1799-1817_s	1799-1817	UUAAUAUGGCAACUGGAAU	809	AUCCAGUUGCCAUAUUAA	1378
NM_001735.2_1809-1827_s	1809-1827	AACUGGAAUGGAUUCUGG	810	CCAGGAAUCCAUUCAGUU	1379
NM_001735.2_1821-1839_s	1821-1839	UUCUGGGUGGCAUUAGCA	811	UGCUA AUGCCACCCAGGAA	1380
NM_001735.2_1830-1848_s	1830-1848	GGCAUAGCAGCAGUGGAC	812	GUCCACUGCUGCUAAUGCC	1381
NM_001735.2_1842-1860_s	1842-1860	AGUGGACAGUGCUGUGUAU	813	AUACACAGCACUGUCCACU	1382

NM_001735.2_1852-1870_s	1852-1870	GCUGUGUAUGGAGUCCAAA	814	UUUGGACUCCAUAACACAGC	1383
NM_001735.2_1863-1881_s	1863-1881	AGUCCAAAGAGGAGCCAAA	815	UUUGGCUCCUCUUUGGACU	1384
NM_001735.2_1870-1888_s	1870-1888	AGAGGAGCCAAAAAGCCCU	816	AGGGCUUUUUGGCUCCUCU	1385
NM_001735.2_1883-1901_s	1883-1901	AGCCCUUGGAAAGAGUAUU	817	AAUACUCUUUCCAAGGGCU	1386
NM_001735.2_1893-1911_s	1893-1911	AAGAGUAUUUCAAUUCUUA	818	UAAGAAUUGAAAUAUCUCUU	1387
NM_001735.2_1900-1918_s	1900-1918	UUUCAAUUCUUAGAGAAGA	819	UCUUCUCUAAGAAUUGAAA	1388
NM_001735.2_1912-1930_s	1912-1930	GAGAAGAGUGAUCUGGGCU	820	AGCCCAGAUCACUCUUCUC	1389
NM_001735.2_1920-1938_s	1920-1938	UGAUCUGGGCUGUGGGGCA	821	UGCCCCACAGCCCAGAUCA	1390
NM_001735.2_1933-1951_s	1933-1951	GGGGCAGGUGGUGGCCUCA	822	UGAGGCCACCACCUGCCCC	1391
NM_001735.2_1943-1961_s	1943-1961	GUGGCCUCAACAAUGCCAA	823	UUGGCAUUGUUGAGGCCAC	1392
NM_001735.2_1950-1968_s	1950-1968	CAACAAUGCCAAUGUGUUC	824	GAACACAUUGGCAUUGUUG	1393
NM_001735.2_1959-1977_s	1959-1977	CAAUGUGUUCCACCUAGCU	825	AGCUAGGUGGAACACAUUG	1394

NM_001735.2_1969-1987_s	1969-1987	CACCUAGCUGGACUUACCU	826	AGGUAAGUCCAGCUAGGUG	1395
NM_001735.2_1979-1997_s	1979-1997	GACUUACCUUCCUCACUAA	827	UUAGUGAGGAAGGUAAGUC	1396
NM_001735.2_1991-2009_s	1991-2009	UCACUAAUGCAAUUGCAGA	828	UCUGCAUUUGCAUUAGUGA	1397
NM_001735.2_2001-2019_s	2001-2019	AAAUGCAGAUAGACUCCCAA	829	UUGGGAGUCAUCUGCAUUU	1398
NM_001735.2_2013-2031_s	2013-2013	CUCCCAAGAAAUGAUGAA	830	UUCAUCAUUUUCUUGGGAG	1399
NM_001735.2_2032-2050_s	2032-2050	CCUUGUAAAGAAAUUCUCA	831	UGAGAAUUUCUUUACAAGG	1400
NM_001735.2_2043-2061_s	2043-2061	AAUUCUCAGGCCAAGAAGA	832	UCUUCUUGGCCUGAGAAUU	1401
NM_001735.2_2053-2071_s	2053-2071	CCAAGAAGAACGCUGCAAA	833	UUUGCAGCGUUCUUCUUGG	1402
NM_001735.2_2063-2081_s	2063-2081	CGCUGCAAAGAAGAUAGA	834	UCUAUCUUCUUUUGCAGCG	1403
NM_001735.2_2070-2088_s	2070-2088	AAAGAAGAUAGAAGAAUA	835	UAUUUCUUCUAUCUUCUUU	1404
NM_001735.2_2082-2100_s	2082-2100	AGAAUAGCUGCUAAAUAU	836	AUAUUUAGCAGCUAUUUCU	1405
NM_001735.2_2089-2107_s	2089-2107	GCUGCUAAAUAUAAACAUU	837	AAUGUUUAUAUUUAGCAGC	1406

NM_001735.2_2103-2121_s	2103-2121	ACAUUCAGUAGUGAAGAAA	838	UUUCUUCACUACUGAAUGU	1407
NM_001735.2_2110-2128_s	2110-2128	GUAGUGAAGAAAUGUUGUU	839	AACAACAUUUCUUCACUAC	1408
NM_001735.2_2119-2137_s	2119-2137	AAAUGUUGUUACGAUGGAG	840	CUCCAUCGUAACAACAUUU	1409
NM_001735.2_2130-2148_s	2130-2148	CGAUGGAGCCUGCGUUAUU	841	AUUAACGCAGGCUCCAUCG	1410
NM_001735.2_2142-2160_s	2142-2160	CGUUAUUAAUGAUGAAACC	842	GGUUUCAUCAUUUAUUAACG	1411
NM_001735.2_2150-2168_s	2150-2168	AUGAUGAAACCGUGAGCA	843	UGCUCACAGGUUUCAUCAU	1412
NM_001735.2_2160-2178_s	2160-2178	CUGUGAGCAGCGAGCUGCA	844	UGCAGCUCGCUGCUCACAG	1413
NM_001735.2_2170-2188_s	2170-2188	CGAGCUGCACGGAUUAGUU	845	AACUAAUCCGUGCAGCUCG	1414
NM_001735.2_2180-2198_s	2180-2198	GGAUUAGUUUAGGGCCAAG	846	CUUGGCCCUAAACUAAUCC	1415
NM_001735.2_2191-2209_s	2191-2209	GGGCCAAGAUGCAUCAAAAG	847	CUUUGAUGCAUCUUGGCC	1416
NM_001735.2_2202-2220_s	2202-2220	CAUCAAGCUUUCACUGAA	848	UUCAGUGAAAGCUUUGAUG	1417
NM_001735.2_2209-2227_s	2209-2227	GCUUUCACUGAAUGUUGUG	849	CACAACAUUCAGUGAAAGC	1418

NM_001735.2_2219-2237_s	2219-2237	AAUGUUGUGUCGUCGCAAG	850	CUUGCGACGACACAACAUU	1419
NM_001735.2_2229-2247_s	2229-2247	CGUCGCAAGCCAGCUCCGU	851	ACGGAGCUGGCUUGCGACG	1420
NM_001735.2_2241-2259_s	2241-2259	GCUCCGUGC UAAUAUCUCU	852	AGAGAUAUUAGCACGGAGC	1421
NM_001735.2_2249-2267_s	2249-2267	CUAAUAUCUCUCAUAAAGA	853	UCUUUAUGAGAGAUUUAG	1422
NM_001735.2_2263-2281_s	2263-2281	AAAGACAUGCAAUUGGGAA	854	UUCCCAAUUGCAUGUCUUU	1423
NM_001735.2_2272-2290_s	2272-2290	CAAUUGGGAAGGCUACACA	855	UGUGUAGCCUCCCAAUUG	1424
NM_001735.2_2283-2301_s	2283-2301	GCUACACAUGAAGACCCUG	856	CAGGGUCUUCAUGUGUAGC	1425
NM_001735.2_2289-2307_s	2289-2307	CAUGAAGACCCUGUUACCA	857	UGGUAACAGGGUCUUCAUG	1426
NM_001735.2_2303-2321_s	2303-2321	UACCAGUAAGCAAGCCAGA	858	UCUGGCUUGCUUACUGGUA	1427
NM_001735.2_2311-2329_s	2311-2329	AGCAAGCCAGAAAUUCGGA	859	UCCGAAUUCUGGCUUGCU	1428
NM_001735.2_2319-2337_s	2319-2337	AGAAAUUCGGAGUUAUUUU	860	AAAUAACUCCGAAUUUCU	1429
NM_001735.2_2329-2347_s	2329-2347	AGUUAUUUCCAGAAAGCU	861	AGCUUUCUGGAAAAUAACU	1430

NM_001735.2_2339-2357_s	2339-2357	CAGAAAGCUGGUUGUGGGA	862	UCCCACAACCAGCUUUCUG	1431
NM_001735.2_2352-2370_s	2352-2370	GUGGGAAGUUCAUCUUGUU	863	AACAAGAUGAACUUCCCAC	1432
NM_001735.2_2361-2379_s	2361-2379	UCAUCUUGUUCCCAGAAGA	864	UCUUCUGGGAACAAGAUGA	1433
NM_001735.2_2372-2390_s	2372-2390	CCAGAAGAAAACAGUUGCA	865	UGCAACUGUUUUCUUCUGG	1434
NM_001735.2_2383-2401_s	2383-2401	CAGUUGCAGUUUGCCCUAC	866	GUAGGGCAAACUGCAACUG	1435
NM_001735.2_2389-2407_s	2389-2407	CAGUUUGCCCUACCUGAUU	867	AAUCAGGUAGGGCAAACUG	1436
NM_001735.2_2401-2419_s	2401-2419	CCUGAUUCUCUAACCACCU	868	AGGUGGUUAGAGAAUCAGG	1437
NM_001735.2_2413-2431_s	2413-2431	ACCACCUGGGAAAUUCAAG	869	CUUGAAUUUCCCAGGUGGU	1438
NM_001735.2_2422-2440_s	2422-2440	GAAAUUCAAGGCGUUGGCA	870	UGCCAACGCCUUGAAUUUC	1439
NM_001735.2_2433-2451_s	2433-2451	CGUUGGCAUUUCAACACU	871	AGUGUUUGAAAUGCCAACG	1440
NM_001735.2_2439-2457_s	2439-2457	CAUUUCAACACUGGUUAUA	872	UAUACCAGUGUUUGAAAUG	1441
NM_001735.2_2453-2471_s	2453-2471	GUAUAUGUGUUGCUGAUAC	873	GUAUCAGCAACACAUAUAC	1442

NM_001735.2_2463-2481_s	2463-2481	UGCUGAUACUGUCAAGGCA	874	UGCCUUGACAGUAUCAGCA	1443
NM_001735.2_2471-2489_s	2471-2489	CUGUCAAGGCAAAGGUGUU	875	AACACCUUUGCCUUGACAG	1444
NM_001735.2_2483-2501_s	2483-2501	AGGUGUUCAAGAUGUCUU	876	AAGACAUCUUUGAACACCU	1445
NM_001735.2_2490-2508_s	2490-2508	CAAAGAUGUCUUCUGGAA	877	UCCAGGAAGACAUCUUUG	1446
NM_001735.2_2499-2517_s	2499-2517	CUUCCUGGAAAUGAAUAUA	878	UAUAUUCAUUCCAGGAAG	1447
NM_001735.2_2511-2529_s	2511-2529	GAAUAUACCAUAUUCUGUU	879	AACAGAAUAUGGUUAUUAUC	1448
NM_001735.2_2520-2538_s	2520-2538	AUAUUCUGUUGUACGAGGA	880	UCCUCGUACAACAGAAUAU	1449
NM_001735.2_2533-2551_s	2533-2551	CGAGGAGAACAGAUCCAAU	881	AUUGGAUCUGUUCUCCUCG	1450
NM_001735.2_2539-2557_s	2539-2557	GAACAGAUCCAAUUGAAAG	882	CUUUCAAUUGGAUCUGUUC	1451
NM_001735.2_2553-2571_s	2553-2571	GAAAGGAACUGUUUACAAC	883	GUUGUAAACAGUCCUUUC	1452
NM_001735.2_2560-2578_s	2560-2578	ACUGUUUACAACUAUAGGA	884	UCCUAUAGUUGUAAACAGU	1453
NM_001735.2_2569-2587_s	2569-2587	AACUAUAGGACUUCUGGGA	885	UCCAGAAGUCCUAUAGUU	1454



NM_001735.2_2583-2601_s	2583-2601	UGGGAUGCAGUUCUGUGUU	886	AACACAGAACUGCAUCCCA	1455
NM_001735.2_2592-2610_s	2592-2610	GUUCUGUGUUAAAAUGUCU	887	AGACAUUUUAACACAGAAC	1456
NM_001735.2_2600-2618_s	2600-2618	UUAAAAUGUCUGCUGUGGA	888	UCCACAGCAGACAUUUUAA	1457
NM_001735.2_2612-2630_s	2612-2630	CUGUGGAGGGAAUCUGCAC	889	GUGCAGAUUCCCUCCACAG	1458
NM_001735.2_2620-2638_s	2620-2638	GGAAUCUGCACUUCGGAAA	890	UUUCCGAAGUGCAGAUUCC	1459
NM_001735.2_2633-2651_s	2633-2651	CGGAAAGCCCAGUCAUUGA	891	UCA AUGACUGGGCUUCCG	1460
NM_001735.2_2641-2659_s	2641-2659	CCAGUCAUUGAUCAUCAGG	892	CCUGAUGAUCAAUGACUGG	1461
NM_001735.2_2653-2671_s	2653-2671	CAUCAGGGCACAAAGUCCU	893	AGGACUUUGUGCCCUGAUG	1462
NM_001735.2_2659-2677_s	2659-2677	GGCACAAAGUCCUCCAAAU	894	AUUUGGAGGACUUUGUGCC	1463
NM_001735.2_2673-2691_s	2673-2691	CAA AUGUGUGCGCCAGAAA	895	UUUCUGGGCGCACACAUUUG	1464
NM_001735.2_2682-2700_s	2682-2700	GCGCCAGAAAGUAGAGGGC	896	GCCCUCUACUUUCUGGGCGC	1465
NM_001735.2_2691-2709_s	2691-2709	AGUAGAGGGCUCCUCCAGU	897	ACUGGAGGAGCCCUCUACU	1466

NM_001735.2_2702-2720_s	2702-2720	CCUCCAGUCACUUGGUGAC	898	GUCACCAAGUGACUGGAGG	1467
NM_001735.2_2709-2727_s	2709-2727	UCACUUGGUGACAUUCACU	899	AGUGAAUGUCACCAAGUGA	1468
NM_001735.2_2720-2738_s	2720-2738	CAUUCACUGUGCUUCCUCU	900	AGAGGAAGCACAGUGAAUG	1469
NM_001735.2_2739-2757_s	2739-2757	GGAAAUUGGCCUUCACAAC	901	GUUGUGAAGGCCAAUUUCC	1470
NM_001735.2_2749-2767_s	2749-2767	CUUCACAACAUCAUUUUU	902	AAAAAUUGAUGUUGUGAAG	1471
NM_001735.2_2761-2779_s	2761-2779	AAUUUUUCACUGGAGACUU	903	AAGUCUCCAGUGAAAAAUU	1472
NM_001735.2_2770-2788_s	2770-2788	CUGGAGACUUGGUUUGGAA	904	UCCAAACCAAGUCUCCAG	1473
NM_001735.2_2780-2798_s	2780-2798	GGUUUGGAAAAGAAAUCUU	905	AAGAUUUCUUUCCAAACC	1474
NM_001735.2_2793-2811_s	2793-2811	AAUCUUAGUAAAAACAUUA	906	UAAUGUUUUACUAAGAUU	1475
NM_001735.2_2802-2820_s	2802-2820	AAAAACAUUACGAGUGGUG	907	CACCACUCGUA AUGUUUUU	1476
NM_001735.2_2813-2831_s	2813-2831	GAGUGGUGCCAGAAGGUGU	908	ACACCUUCUGGCACCACUC	1477
NM_001735.2_2823-2841_s	2823-2841	AGAAGGUGUCAAAAAGGGAA	909	UUCCCUUUUGACACCUUCU	1478

NM_001735.2_2829-2847_s	2829-2847	UGUCAAAAAGGGAAAGCUAU	910	AUAGCUUUCUUUUGACA	1479
NM_001735.2_2843-2861_s	2843-2861	GCUAUUCUGGUGUUACUUU	911	AAAGUAACACCAGAAUAGC	1480
NM_001735.2_2852-2870_s	2852-2870	GUGUUACUUUGGAUCCUAG	912	CUAGGAUCCAAAGUAACAC	1481
NM_001735.2_2862-2880_s	2862-2880	GGAUCCUAGGGGUUUUUU	913	AUAAAUACCCCUAGGAUCC	1482
NM_001735.2_2872-2890_s	2872-2890	GGUAUUUAUGGUACCAUUA	914	UAAUGGUACCAUAAAUACC	1483
NM_001735.2_2882-2900_s	2882-2900	GUACCAUUAGCAGACGAAA	915	UUUCGUCUGCUAAUGGUAC	1484
NM_001735.2_2892-2910_s	2892-2910	CAGACGAAAGGAGUCCCA	916	UGGGAACUCCUUUCGUCUG	1485
NM_001735.2_2900-2918_s	2900-2918	AGGAGUCCCAUACAGGAU	917	AUCCUGUAUGGGAACUCCU	1486
NM_001735.2_2909-2927_s	2909-2927	CAUACAGGAUACCCUUAGA	918	UCUAAGGGUAUCCUGUAUG	1487
NM_001735.2_2922-2940_s	2922-2940	CUUAGAUUUGGUCCCCAAA	919	UUUGGGGACCAAUCUAAG	1488
NM_001735.2_2933-2951_s	2933-2951	UCCCCAAAACAGAAUCAA	920	UUGAUUUCUGUUUUGGGGA	1489
NM_001735.2_2941-2959_s	2941-2959	ACAGAAAUCAAAGGAUUU	921	AAAUCCUUUUGAUUUCUGU	1490

NM_001735.2_2951-2969_s	2951-2969	AAAGGAUUUUGAGUGUAAA	922	UUUACACUCAAAAUCCUUU	1491
NM_001735.2_2962-2980_s	2962-2980	AGUGUAAAAGGACUGCUUG	923	CAAGCAGUCCUUUUACACU	1492
NM_001735.2_2969-2987_s	2969-2987	AAGGACUGCUUGUAGGUGA	924	UCACCUACAAGCAGUCCUU	1493
NM_001735.2_2980-2998_s	2980-2998	GUAGGUGAGAUCUUGUCUG	925	CAGACAAGAUCUCACCUAC	1494
NM_001735.2_2989-3007_s	2989-3007	AUCUUGUCUGCAGUUCUAA	926	UUAGAACUGCAGACAAGAU	1495
NM_001735.2_3001-3019_s	3001-3019	GUUCUAAGUCAGGAAGGCA	927	UGCCUUCUGACUAGAAC	1496
NM_001735.2_3013-3031_s	3013-3031	GAAGGCAUCAUAUCCUAA	928	UUAGGAUAUUGAUGCCUUC	1497
NM_001735.2_3020-3038_s	3020-3038	UCAUAUCCUAACCCACCU	929	AGGUGGGUUAGGAUAUUGA	1498
NM_001735.2_3033-3051_s	3033-3051	CCACCUCCCCAAAGGGAGU	930	ACUCCCUUUGGGGAGGUGG	1499
NM_001735.2_3039-3057_s	3039-3057	CCCCAAAGGGAGUGCAGAG	931	CUCUGCACUCCCUUUGGGG	1500
NM_001735.2_3050-3068_s	3050-3068	GUGCAGAGGCGGAGCUGAU	932	AUCAGCUCGCCUCUGCAC	1501
NM_001735.2_3060-3078_s	3060-3078	GGAGCUGAUGAGCGUUGUC	933	GACAACGCUCAUCAGCUCC	1502

NM_001735.2_3072-3090_s	3072-3090	CGUUGUCCCAGUAUUCUAU	934	AUAGAAUACUGGGACAACG	1503
NM_001735.2_3079-3097_s	3079-3097	CCAGUAUUCUAUGUUUUUC	935	GAAAAACAUAGAAUACUGG	1504
NM_001735.2_3091-3109_s	3091-3109	GUUUUUCACUACCUGGAAA	936	UUUCCAGGUAGUGAAAAAC	1505
NM_001735.2_3102-3120_s	3102-3120	CCUGGAAACAGGAAAUCAU	937	AUGAUUUCUGUUUCCAGG	1506
NM_001735.2_3122-3140_s	3122-3140	GGAACAUUUUUCAUUCUGA	938	UCAGAAUGAAAAAUGUUCC	1507
NM_001735.2_3133-3151_s	3133-3151	CAUUCUGACCCAUUAAUUG	939	CAAUUAAUGGGUCAGAAUG	1508
NM_001735.2_3142-3160_s	3142-3160	CCAUUAAUUGAAAAGCAGA	940	UCUGCUUUUCAAUUAAUGG	1509
NM_001735.2_3153-3171_s	3153-3171	AAAGCAGAAACUGAAGAAA	941	UUUCUUCAGUUUCUGCUUU	1510
NM_001735.2_3161-3179_s	3161-3179	AACUGAAGAAAAAUUAAA	942	UUUAAUUUUUUCUUCAGUU	1511
NM_001735.2_3169-3187_s	3169-3187	AAAAAAUUAAGAAGGGA	943	UCCCUUCUUUUAUUUUUU	1512
NM_001735.2_3183-3201_s	3183-3201	AGGGAUGUUGAGCAUUAUG	944	CAUAAUGCUCACAUCCCU	1513
NM_001735.2_3192-3210_s	3192-3210	GAGCAUUAUGUCCUACAGA	945	UCUGUAGGACAUAAUGCUC	1514

NM_001735.2_3200-3218_s	3200-3218	UGUCCUACAGAAAUGCUGA	946	UCAGCAUUUCUGUAGGACA	1515
NM_001735.2_3211-3229_s	3211-3229	AAUGCUGACUACUCUUACA	947	UGUAAGAGUAGUCAGCAUU	1516
NM_001735.2_3220-3238_s	3220-3238	UACUCUUACAGUGUGUGGA	948	UCCACACACUGUAAGAGUA	1517
NM_001735.2_3229-3247_s	3229-3247	AGUGUGUGGAAGGGUGGAA	949	UUCCACCCUCCACACACU	1518
NM_001735.2_3240-3258_s	3240-3258	GGGUGGAAGUGCUAGCACU	950	AGUGCUAGCACUCCACCC	1519
NM_001735.2_3250-3268_s	3250-3268	GCUAGCACUUGGUUACAG	951	CUGUUAACCAAGUGCUAGC	1520
NM_001735.2_3260-3278_s	3260-3278	GGUUAACAGCUUUUGCUIIU	952	AAAGCAAAGCUGUUAACC	1521
NM_001735.2_3273-3291_s	3273-3291	UGCUUUAAGAGUACUUGGA	953	UCCAAGUACUCUUAAGCA	1522
NM_001735.2_3283-3301_s	3283-3301	GUACUUGGACAAGUAAAUA	954	UAUUUACUUGUCCAAGUAC	1523
NM_001735.2_3292-3310_s	3292-3317	CAAGUAAAUAAAUACGUAG	955	CUACGUUUUUUUUACUUG	1524
NM_001735.2_3299-3317_s	3299-3317	AUAAAUACGUAGAGCAGAA	956	UUCUGCUCUACGUUUUUU	1525
NM_001735.2_3310-3328_s	3310-3328	GAGCAGAACCAAAAUUCA	957	UUGAAUUUUUGGUUCUGCUC	1526

NM_001735.2_3322-3340_s	3322-3340	AAUUCAAUUUGUAAUUCUU	958	AAGAAUUACAAAUUGAAUU	1527
NM_001735.2_3332-3350_s	3332-3350	GUAAUUCUUUAUUGUGGCU	959	AGCCACAAUAAAGAAUUAC	1528
NM_001735.2_3342-3360_s	3342-3360	AUUGUGGCUAGUUGAGAAU	960	AUUCUCAACUAGCCACAAU	1529
NM_001735.2_3349-3367_s	3349-3367	CUAGUUGAGAAUUAUCAAU	961	AUUGAUAAUUCUCAACUAG	1530
NM_001735.2_3360-3378_s	3360-3378	UUAUCAAUUAGAUAAUGGA	962	UCCAUAUUCUAAUUGAUAA	1531
NM_001735.2_3373-3391_s	3373-3391	AAUGGAUCUUUCAAGGAAA	963	UUUCCUUGAAAGAUCCAUU	1532
NM_001735.2_3380-3398_s	3380-3398	CUUUCAAGGAAAUUCACA	964	UGUGAAUUUCCUUGAAAG	1533
NM_001735.2_3391-3409_s	3391-3409	AAUUCACAGUAUCAACCAA	965	UUGGUUGAUACUGUGAAUU	1534
NM_001735.2_3399-3417_s	3399-3417	GUAUCAACCAAUAAAUA	966	UAAUUUAUUGGUUGAUAC	1535
NM_001735.2_3411-3429_s	3411-3429	AAAUAUACAGGGUACCUUG	967	CAAGGUACCCUGUAAUUUU	1536
NM_001735.2_3419-3437_s	3419-3437	AGGGUACCUUGCCUGUUGA	968	UCAACAGGCAAGGUACCCU	1537
NM_001735.2_3433-3451_s	3433-3451	GUUGAAGCCCGAGAGAACA	969	UGUUCUCUCGGGCUUCAAC	1538

NM_001735.2_3441-3459_s	3441-3559	CCGAGAGAACAGCUUAUUAU	970	AUAUAAGCUGUUCUCUCGG	1539
NM_001735.2_3452-3470_s	3452-3470	GCUUAUAUCUUACAGCCUU	971	AAGGCUGUAAGAUUAUAAGC	1540
NM_001735.2_3460-3478_s	3460-3478	CUUACAGCCUUUACUGUGA	972	UCACAGUAAAGGCUGUAAG	1541
NM_001735.2_3482-3500_s	3482-3500	GAAUUAGAAAGGCUUUCGA	973	UCGAAAGCCUUUCUAAUUC	1542
NM_001735.2_3492-3510_s	3492-3510	GGCUUUCGAUAUAUGCCCC	974	GGGGCAUAUAUCGAAAGCC	1543
NM_001735.2_3499-3517_s	3499-3517	GAUAUAUGCCCCUGGUGA	975	UCACCAGGGGGCAUAUAUC	1544
NM_001735.2_3513-3531_s	3513-3531	GGUGAAAUCGACACAGCU	976	AGCUGUGUCGAUUUUCACC	1545
NM_001735.2_3522-3540_s	3522-3540	CGACACAGCUCUAAUUAAA	977	UUUAAUUAGAGCUGUGUCG	1546
NM_001735.2_3529-3547_s	3529-3547	GCUCUAAUUAAAGCUGACA	978	UGUCAGCUUUAUUAGAGC	1547
NM_001735.2_3542-3560_s	3542-3560	CUGACAACUUUCUGCUUGA	979	UCAAGCAGAAAGUUGUCAG	1548
NM_001735.2_3549-3567_s	3549-3567	CUUUCUGCUUGAAAUAACA	980	UGUAUUUUAAGCAGAAAG	1549
NM_001735.2_3560-3578_s	3560-3578	AAAAUACACUGCCAGCCCA	981	UGGGCUGGCAGUGUAUUUU	1550



NM_001735.2_3573-3591_s	3573-3591	AGCCCAGAGCACCUUUACA	982	UGUAAAGGUGCUCUGGGCU	1551
NM_001735.2_3581-3599_s	3581-3599	GCACCUUUACAUUGGCCAU	983	AUGGCCAAUGUAAAGGUGC	1552
NM_001735.2_3589-3607_s	3589-3607	ACAUUGGCCAUUUCUGCGU	984	ACGCAGAAAUGGCCAAUGU	1553
NM_001735.2_3602-3620_s	3602-3620	CUGCGUAUGCUCUUUCCCU	985	AGGGAAAGAGCAUACGCAG	1554
NM_001735.2_3613-3631_s	3613-3631	CUUUCCUGGGAGAUAAAA	986	UUUUAUCUCCCAGGGAAAG	1555
NM_001735.2_3623-3641_s	3623-3641	GAGAUAAAACUCACCCACA	987	UGUGGGUGAGUUUUAUCUC	1556
NM_001735.2_3631-3649_s	3631-3649	ACUCACCCACAGUUUCGUU	988	AACGAAACUGUGGGUGAGU	1557
NM_001735.2_3640-3658_s	3640-3658	CAGUUUCGUUCAAUUGUUU	989	AAACAAUUGAACGAAACUG	1558
NM_001735.2_3650-3668_s	3650-3668	CAAUUGUUUCAGCUUUGAA	990	UUCAAAGCUGAAACAAUUG	1559
NM_001735.2_3662-3680_s	3662-3680	CUUUGAAGAGAGAAGCUUU	991	AAAGCUUCUCUCUCAAAG	1560
NM_001735.2_3669-3687_s	3669-3687	GAGAGAAGCUUUGGUUAAA	992	UUUAACCAAAGCUUCUCUC	1561
NM_001735.2_3682-3700_s	3682-3700	GUUAAAGGUAUCCACCCA	993	UGGGUGGAUUACCUUUAAC	1562

NM_001735.2_3691-3709_s	3691-3709	AAUCCACCCAUUUAUCGUU	994	AACGAUAAAUGGGUGGAUU	1563
NM_001735.2_3699-3717_s	3699-3717	CAUUUAUCGUUUUUGGAAA	995	UUUCCAAAAACGAUAAAUG	1564
NM_001735.2_3710-3728_s	3710-3728	UUUGGAAAGACAAUCUUCA	996	UGAAGAUUGUCUUUCCAAA	1565
NM_001735.2_3721-3739_s	3721-3739	AAUCUUCAGCAUAAAGACA	997	UGUCUUUAUGCUGAAGAUU	1566
NM_001735.2_3730-3748_s	3730-3748	CAUAAAGACAGCUCUGUAC	998	GUACAGAGCUGUCUUUAUG	1567
NM_001735.2_3741-3759_s	3741-3759	CUCUGUACCUAACACUGGU	999	ACCAGUGUUAGGUACAGAG	1568
NM_001735.2_3752-3770_s	3752-3770	ACACUGGUACGGCACGUAU	1000	AUACGUGCCGUACCAGUGU	1569
NM_001735.2_3762-3780_s	3762-3780	GGCACGUAUGGUAGAAACA	1001	UGUUUCUACCAUACGUGCC	1570
NM_001735.2_3771-3789_s	3771-3789	GGUAGAAACAACUGCCUAU	1002	AUAGGCAGUUGUUUCUACC	1571
NM_001735.2_3779-3797_s	3779-3797	CAACUGCCUAUGCUUUACU	1003	AGUAAAGCAUAGGCAGUUG	1572
NM_001735.2_3791-3809_s	3791-3809	CUUUACUCACCAGUCUGAA	1004	UUCAGACUGGUGAGUAAAG	1573
NM_001735.2_3803-3821_s	3803-3821	GUCUGAACUUGAAAGAUAU	1005	AUAUCUUUCAAGUUCAGAC	1574

NM_001735.2_3809-3827_s	3809-3827	ACUUGAAAGAUUAAAUUA	1006	UAAUUUAUAUCUUUCAAGU	1575
NM_001735.2_3819-3837_s	3819-3837	UAUAAAUAUGUUAACCCA	1007	UGGGUUAACAUAUUUAUA	1576
NM_001735.2_3829-3847_s	3829-3847	GUUAACCCAGUCAUCAAU	1008	AUUUGAUGACUGGGUUAAC	1577
NM_001735.2_3839-3857_s	3839-3857	UCAUCAAAUGGCUAUCAGA	1009	UCUGAUAGCCAUUUGAUGA	1578
NM_001735.2_3851-3869_s	3851-3869	UAUCAGAAGAGCAGAGGUA	1010	UACCUCUGCUCUUCUGAUA	1579
NM_001735.2_3863-3881_s	3863-3881	AGAGGUAUGGAGGUGGCUU	1011	AAGCCACCUCCAUAACCUCU	1580
NM_001735.2_3872-3890_s	3872-3890	GAGGUGGCUUUUUAUUCAAC	1012	GUUGAAUAAAAGCCACCUC	1581
NM_001735.2_3883-3901_s	3883-3901	UAUUCAACCCAGGACACAA	1013	UUGUGUCCUGGGUUGAAUA	1582
NM_001735.2_3893-3911_s	3893-3911	AGGACACAAUCAUUGCCA	1014	AUGGCAUUGAUUGUGUCCU	1583
NM_001735.2_3899-3917_s	3899-3917	CAAUCAUUGCCAUUGAGGG	1015	CCCUCAAUGGCAUUGAUUG	1584
NM_001735.2_3909-3927_s	3909-3927	CAUUGAGGGCCUGACGGAA	1016	UUCCGUCAGGCCCUCAAUG	1585
NM_001735.2_3922-3940_s	3922-3940	ACGGAAUAUUCACUCCUGG	1017	CCAGGAGUGAAUAUCCGU	1586

NM_001735.2_3930-3948_s	3930-3948	UUCACUCCUGGUUAAACAA	1018	UUGUUUAACCAGGAGUGAA	1587
NM_001735.2_3939-3957_s	3939-3957	GGUUAACAACUCCGCUUG	1019	CAAGCGGAGUUGUUUAACC	1588
NM_001735.2_3951-3969_s	3951-3969	CCGCUUGAGUAUGGACAUC	1020	GAUGUCCAUAUCAAGCGG	1589
NM_001735.2_3963-3981_s	3963-3981	GGACAUCGAUGUUUCUAC	1021	GUAAGAAACAUCGAUGUCC	1590
NM_001735.2_3969-3987_s	3969-3987	CGAUGUUUCUACAAGCAU	1022	AUGCUUGUAAGAAACAUCG	1591
NM_001735.2_3981-3999_s	3981-3999	CAAGCAUAAAGGUGCCUUA	1023	UAAGGCACCUUUUAUGCUUG	1592
NM_001735.2_3992-4010_s	3992-4010	GUGCCUACAUAAUUUAUA	1024	UUAAUUAUGUAAGGCAC	1593
NM_001735.2_3999-4017_s	3999-4017	ACAUAAUUAUAAAUGACA	1025	UGUCAUUUUAUAAUUAUGU	1594
NM_001735.2_4009-4027_s	4009-4027	AAAUGACAGACAAGAAU	1026	AAUUCUUGUCUGUCAUUUU	1595
NM_001735.2_4020-4038_s	4020-4038	CAAGAAUUUCCUUGGGAGG	1027	CCUCCCAAGGAAUUCUUG	1596
NM_001735.2_4029-4047_s	4029-4047	CCUUGGGAGGCCAGUAGAG	1028	CUCUACUGGCCUCCCAAGG	1597
NM_001735.2_4041-4059_s	4041-4059	AGUAGAGGUGCUUCUCAAU	1029	AUUGAGAAGCACCUCUACU	1598

NM_001735.2_4051-4069_s	4051-4069	CUUCUCAAUGAUGACCUCA	1030	UGAGGUCAUCAUUGAGAAG	1599
NM_001735.2_4062-4080_s	4062-4080	UGACCUCAUUGUCAGUACA	1031	UGUACUGACAAUGAGGUCA	1600
NM_001735.2_4072-4090_s	4072-4090	GUCAGUACAGGAUUUGGCA	1032	UGCCAAAUCCUGUACUGAC	1601
NM_001735.2_4080-4098_s	4080-4098	AGGAUUUGGCAGUGGCUUG	1033	CAAGCCACUGCCAAAUCCU	1602
NM_001735.2_4092-4110_s	4092-4110	UGGCUUGGCUACAGUACAU	1034	AUGUACUGUAGCCAAGCCA	1603
NM_001735.2_4099-4117_s	4099-4117	GCUACAGUACAUGUAACAA	1035	UUGUUACAUGUACUGUAGC	1604
NM_001735.2_4113-4131_s	4113-4131	AACAACUGUAGUUCACAAA	1036	UUUGUGAACUACAGUUGUU	1605
NM_001735.2_4120-4138_s	4120-4138	GUAGUUCACAAAACCAGUA	1037	UACUGGUUUUGUGAACUAC	1606
NM_001735.2_4130-4148_s	4130-4148	AAACCAGUACCUCUGAGGA	1038	UCCUCAGAGGUACUGGUUU	1607
NM_001735.2_4143-4161_s	4143-4161	UGAGGAAGUUUGCAGCUUU	1039	AAAGCUGCAAACUCCUCA	1608
NM_001735.2_4153-4171_s	4153-4171	UGCAGCUUUUAUUUGAAAA	1040	UUUUCAAAUAAAAGCUGCA	1609
NM_001735.2_4163-4181_s	4163-4181	AUUUGAAAAUCGAUACUCA	1041	UGAGUAUCGAUUUUCAAAU	1610

NM_001735.2_4173-4191_s	4173-4191	CGAUACUCAGGAUUAUUGAA	1042	UUCAAUAUCCUGAGUAUCG	1611
NM_001735.2_4182-4200_s	4182-4200	GGAUUAUGAAGCAUCCCAC	1043	GUGGGAUGCUUCAUAUCC	1612
NM_001735.2_4189-4207_s	4189-4207	GAAGCAUCCCACUACAGAG	1044	CUCUGUAGUGGGAUGCUUC	1613
NM_001735.2_4199-4217_s	4199-4217	ACUACAGAGGCUACGGAAA	1045	UUUCCGUAGCCUCUGUAGU	1614
NM_001735.2_4212-4230_s	4212-4230	CGGAAACUCUGAUUACAAA	1046	UUUGUAAUCAGAGUUUCCG	1615
NM_001735.2_4221-4239_s	4221-4239	UGAUUACAAACGCAUAGUA	1047	UACUAUGCGUUUGUAAUCA	1616
NM_001735.2_4232-4250_s	4232-4250	GCAUAGUAGCAUGUGCCAG	1048	CUGGCACAUGCUACUAUGC	1617
NM_001735.2_4240-4258_s	4240-4258	GCAUGUGCCAGCUACAAGC	1049	GCUUGUAGCUGGCACAUGC	1618
NM_001735.2_4251-4269_s	4251-4269	CUACAAGCCCAGCAGGGAA	1050	UUCCCUGCUGGGCUUGUAG	1619
NM_001735.2_4260-4278_s	4260-4278	CAGCAGGGAAGAAUCAUCA	1051	UGAUGAUUCUUCCCUGCUG	1620
NM_001735.2_4270-4288_s	4270-4288	GAAUCAUCAUCUGGAUCCU	1052	AGGAUCCAGAUGAUGAUUC	1621
NM_001735.2_4283-4301_s	4283-4301	GAUCCUCUCAUGCGGUGAU	1053	AUCACCGCAUGAGAGGAUC	1622

NM_001735.2_4289-4307_s	4289-4307	CUCAUGC GGUGAUGGACAU	1054	AUGUCCAUCACCGCAUGAG	1623
NM_001735.2_4299-4317_s	4299-4317	GAUGGACAUCUCCUUGCCU	1055	AGGCAAGGAGAUGUCCAUC	1624
NM_001735.2_4311-4329_s	4311-4329	CUUGCCUACUGGAAUCAGU	1056	ACUGAUUCCAGUAGGCAAG	1625
NM_001735.2_4322-4340_s	4322-4340	GAAUCAGUGCAAUAUGAAGA	1057	UCUUCAUUUGCACUGAUUC	1626
NM_001735.2_4332-4350_s	4332-4350	AAAUGAAGAAGACUAAAA	1058	UUUUAAGUCUUCUUCAUUU	1627
NM_001735.2_4339-4357_s	4339-4357	GAAGACUAAAAAGCCCUUG	1059	CAAGGGCUUUUAAGUCUUC	1628
NM_001735.2_4353-4371_s	4353-4371	CCUUGUGGAAGGGGUGGAU	1060	AUCCACCCCUUCCACAAGG	1629
NM_001735.2_4360-4378_s	4360-4378	GAAGGGGUGGAUCAACUAU	1061	AUAGUUGAUCCACCCCUUC	1630
NM_001735.2_4370-4388_s	4370-4388	AUCAACUAUUCACUGAUUA	1062	UAAUCAGUGAAUAGUUGAU	1631
NM_001735.2_4380-4398_s	4380-4398	CACUGAUUACCAAUAUCAA	1063	UUUGAUUUGGUAUUCAGUG	1632
NM_001735.2_4393-4411_s	4393-4411	AUCAAGAUGGACAUGUUA	1064	UAACAUGUCCAUCUUUGAU	1633
NM_001735.2_4402-4420_s	4402-4420	GGACAUGUUUUCUGCAAC	1065	GUUGCAGAAUAACAUGUCC	1634

NM_001735.2_4413-4431_s	4413-4431	UCUGCAACUGAAUUCGAUU	1066	AAUCGAAUUCAGUUGCAGA	1635
NM_001735.2_4422-4440_s	4422-4440	GAAUUCGAUUCCCUCCAGU	1067	ACUGGAGGGAAUCGAAUUC	1636
NM_001735.2_4432-4450_s	4432-4450	CCCUCCAGUGAUUCCUUU	1068	AAAGGAAAUCACUGGAGGG	1637
NM_001735.2_4441-4459_s	4441-4459	GAUUUCCUUUGUGUACGAU	1069	AUCGUACACAAAGGAAAUC	1638
NM_001735.2_4453-4471_s	4453-4471	GUACGAUUCGGAUUUUG	1070	CAAUAUCCGGAAUCGUAC	1639
NM_001735.2_4462-4480_s	4462-4480	CGGAUUAUUUGAACUCUUUG	1071	CAAAGAGUUCAAAUAUCCG	1640
NM_001735.2_4473-4491_s	4473-4491	ACUCUUUGAAGUUGGGUUU	1072	AAACCCAACUUCAAAGAGU	1641
NM_001735.2_4482-4500_s	4482-4500	AGUUGGGUUUCUCAGUCCU	1073	AGGACUGAGAAACCCAACU	1642
NM_001735.2_4490-4508_s	4490-4508	UUCUCAGUCCUGCCACUUU	1074	AAAGUGGCAGGACUGAGAA	1643
NM_001735.2_4503-4521_s	4503-4521	CACUUUCACAGUGUACGAA	1075	UUCGUACACUGUGAAAGUG	1644
NM_001735.2_4509-4527_s	4509-4527	CACAGUGUACGAAUACCAC	1076	GUGGUUAUUCGUACACUGUG	1645
NM_001735.2_4523-4541_s	4523-4541	ACCACAGACCAGAUAAACA	1077	UGUUUAUCUGGUCUGUGGU	1646



NM_001735.2_4531-4549_s	4531-4549	CCAGAUAAACAGUGUACCA	1078	UGGUACACUGUUUAUCUGG	1647
NM_001735.2_4540-4558_s	4540-4558	CAGUGUACCAUGUUUUUAUA	1079	UAUAAAACAUGGUACACUG	1648
NM_001735.2_4551-4569_s	4551-4569	GUUUUAUAGCACUCCAAU	1080	AUUGGAAGUGCUAUAAAAC	1649
NM_001735.2_4562-4580_s	4562-4580	CUUCCAAUAUCAAAAUUCA	1081	UGAAUUUUGAUUUGGAAG	1650
NM_001735.2_4570-4588_s	4570-4588	AUCAAAAUUCAGAAAGUCU	1082	AGACUUUCUGAAUUUUGAU	1651
NM_001735.2_4581-4599_s	4581-4599	GAAAGUCUGUGAAGGAGCC	1083	GGCUCCUUCACAGACUUUC	1652
NM_001735.2_4591-4609_s	4591-4609	GAAGGAGCCGCGUGCAAGU	1084	ACUUGCACGCGGCUCUUUC	1653
NM_001735.2_4601-4619_s	4601-4619	CGUGCAAGUGUGUAGAAGC	1085	GCUUCUACACACUUGCACG	1654
NM_001735.2_4612-4630_s	4612-4630	GUAGAAGCUGAUUGUGGGC	1086	GCCCACAAUCAGCUUCUAC	1655
NM_001735.2_4619-4637_s	4619-4637	CUGAUUGUGGGCAAUGCA	1087	UGCAUUUGCCCACAAUCAG	1656
NM_001735.2_4629-4647_s	4629-4647	GCAAUUGCAGGAAGAAUUG	1088	CAAUUCUCCUGCAUUUGC	1657
NM_001735.2_4639-4657_s	4639-4657	GAAGAAUUGGAUCUGACAA	1089	UUGUCAGAUCCAAUUCUUC	1658

NM_001735.2_4651-4669_s	4651-4669	CUGACAAUCUCUGCAGAGA	1090	UCUCUGCAGAGAUUGUCAG	1659
NM_001735.2_4663-4681_s	4663-4681	GCAGAGACAAGAAAACAAA	1091	UUUGUUUUCUUGUCUCUGC	1660
NM_001735.2_4670-4688_s	4670-4688	CAAGAAAACAAACAGCAUG	1092	CAUGCUGUUUGUUUUCUUG	1661
NM_001735.2_4681-4699_s	4681-4699	ACAGCAUGUAAACCAGAGA	1093	UCUCUGGUUUACAUGCUGU	1662
NM_001735.2_4693-4711_s	4693-4711	CCAGAGAUUGCAUAUGCUU	1094	AAGCAUAUGCAAUCUCUGG	1663
NM_001735.2_4702-4720_s	4702-4720	GCAUAUGCUUAUAAAGUUA	1095	UAACUUUAUAAGCAUAUGC	1664
NM_001735.2_4710-4728_s	4710-4728	UUAUAAAGUUAGCAUCACA	1096	UGUGAUGCUAACUUUAUAA	1665
NM_001735.2_4722-4740_s	4722-4740	CAUCACAUCCAUCACUGUA	1097	UACAGUGAUGGAUGUGAUG	1666
NM_001735.2_4733-4751_s	4733-4751	UCACUGUAGAAAUGUUUU	1098	AAAACAUUUUCUACAGUGA	1667
NM_001735.2_4740-4758_s	4740-4758	AGAAAAUGUUUUUGUCAAG	1099	CUUGACAAAACAUUUUCU	1668
NM_001735.2_4750-4768_s	4750-4768	UUUGUCAAGUACAAGGCAA	1100	UUGCCUUGUACUUGACAAA	1669
NM_001735.2_4763-4781_s	4763-4781	AGGCAACCCUUCUGGAUUAU	1101	AUAUCCAGAAGGGUUGCCU	1670

NM_001735.2_4770-4788_s	4770-4788	CCUUCUGGAUAUCUACAAA	1102	UUUGUAGAUAUCCAGAAGG	1671
NM_001735.2_4779-4797_s	4779-4797	UAUCUACAAAACUGGGGAA	1103	UUCCCCAGUUUUGUAGAU	1672
NM_001735.2_4790-4808_s	4790-4808	CUGGGGAAGCUGUUGCUGA	1104	UCAGCAACAGCUUCCCCAG	1673
NM_001735.2_4799-4817_s	4799-4817	CUGUUGCUGAGAAAGACUC	1105	GAGUCUUUCUCAGCAACAG	1674
NM_001735.2_4813-4831_s	4813-4831	GACUCUGAGAUUACCUUCA	1106	UGAAGGUAUUCUCAGAGUC	1675
NM_001735.2_4819-4837_s	4819-4837	GAGAUUACCUUCAUUAAAA	1107	UUUUAUGAAGGUAAUCUC	1676
NM_001735.2_4831-4849_s	4831-4849	AUUAAAAAGGUAACCUGUA	1108	UACAGGUUACCUUUUUAU	1677
NM_001735.2_4841-4859_s	4841-4859	UAACCGUACUAACGCUGA	1109	UCAGCGUUAGUACAGGUUA	1678
NM_001735.2_4850-4868_s	4850-4868	CUAACGCUGAGCUGGUAAA	1110	UUUACCAGCUCAGCGUUAG	1679
NM_001735.2_4863-4881_s	4863-4881	GGUAAAAGGAAGACAGUAC	1111	GUACUGUCUCCUUUUACC	1680
NM_001735.2_4871-4889_s	4871-4889	GAAGACAGUACUAAUUUAU	1112	AUAAUUAGUACUGUCUUC	1681
NM_001735.2_4881-4899_s	4881-4899	CUUAAUUAUGGGUAAAGAA	1113	UUCUUUACCCAUAUUUAAG	1682

NM_001735.2_4893-4911_s	4893-4911	UAAAGAAGCCCUCAGAU	1114	UAUCUGGAGGGCUUCUUUA	1683
NM_001735.2_4902-4920_s	4902-4920	CCUCCAGAUAAAAUACAAU	1115	AUUGUAUUUUUAUCUGGAGG	1684
NM_001735.2_4912-4930_s	4912-4930	AAAUACAAUUUCAGUUUCA	1116	UGAAACUGAAAUUGUAUUU	1685
NM_001735.2_4923-4941_s	4923-4941	CAGUUUCAGGUACAUCUAC	1117	GUAGAUGUACCUGAAACUG	1686
NM_001735.2_4931-4949_s	4931-4949	GGUACAUCUACCCUUUAGA	1118	UCUAAAGGGUAGAUGUACC	1687
NM_001735.2_4942-4960_s	4942-4960	CCUUUAGAUUCCUUGACCU	1119	AGGUCAAGGAAUCUAAAGG	1688
NM_001735.2_4952-4970_s	4952-4970	CCUUGACCUGGAUUGAAUA	1120	UAUUCAAUCCAGGUCAAGG	1689
NM_001735.2_4961-4979_s	4961-4979	GGAUUGAAUACUGGCCUAG	1121	CUAGGCCAGUAUUCAAUCC	1690
NM_001735.2_4971-4989_s	4971-4989	CUGGCCUAGAGACACAACA	1122	UGUUGUGUCUCUAGGCCAG	1691
NM_001735.2_4979-4997_s	4979-4997	GAGACACAACAUGUUCAUC	1123	GAUGAACAUGUUGUGUCUC	1692
NM_001735.2_4991-5009_s	4991-5009	GUUCAUCGUGUCAAGCAUU	1124	AAUGCUUGACACGAUGAAC	1693
NM_001735.2_5000-5018_s	5000-5018	GUCAAGCAUUUUUAGCUAA	1125	UUAGCUAAAAAUGCUUGAC	1694

NM_001735.2_5013-5031_s	5013-5031	AGCUAAUUUAGAUGAAUUU	1126	AAAUUCAUCUAAAUUAGCU	1695
NM_001735.2_5022-5040_s	5022-5040	AGAUGAAUUUGCCGAAGAU	1127	AUCUUCGGCAAUUUCAUCU	1696
NM_001735.2_5033-5051_s	5033-5051	CCGAAGAUAUUCUUUUUAAA	1128	UUUAAAAAGAUUUCUUCGG	1697
NM_001735.2_5043-5061_s	5043-5061	CUUUUUAAAUGGAUGCUIAA	1129	UUAGCAUCCAUUUAAAAAG	1698
NM_001735.2_5053-5071_s	5053-5071	GGAUGCUIAAAUCCUGAA	1130	UUCAGGAAUUUUAGCAUCC	1699
NM_001735.2_5059-5077_s	5059-5077	UAAAUAUCCUGAAGUUCAG	1131	CUGAACUUCAGGAAUUUUUA	1700
NM_001735.2_5071-5089_s	5071-5089	AGUUCAGCUGCAUACAGUU	1132	AACUGUAUGCAGCUGAACU	1701
NM_001735.2_5080-5098_s	5080-5098	GCAUACAGUUUGCACUUUAU	1133	AUAAGUGCAAACUGUAUGC	1702
NM_001735.2_5093-5111_s	5093-5111	ACUUAUGGACUCCUGUUGU	1134	ACAACAGGAGUCCAUAAGU	1703
NM_001735.2_5099-5117_s	5099-5117	GGACUCCUGUUGUUGAAGU	1135	ACUUCAACAACAGGAGUCC	1704
NM_001735.2_5109-5127_s	5109-5127	UGUUGAAGUUCGUUUUUUU	1136	AAAAAACGAACUUCAACA	1705
NM_001735.2_5122-5140_s	5122-5140	UUUUUUGUUUCUUCUUUU	1137	AAAAGAAGAAAACAAAAAA	1706

NM_001735.2_5132-5150_s	5132-5150	UCUUCUUUUUUUAAACAUI	1138	AAUGUUUAAAAAAGAAGA	1707
NM_001735.2_5139-5157_s	5139-5157	UUUUUAAACAUIUCAUAGCU	1139	AGCUAUGAAUGUUUAAAAA	1708
NM_001735.2_5152-5170_s	5152-5170	AUAGCUGGUCUUAUUUGUA	1140	UACAAAUAAGACCAGCUAU	1709
NM_001735.2_5159-5177_s	5159-5177	GUCUUAUUUGUAAAGCUCA	1141	UGAGCUUUACAAAUAAGAC	1710
NM_001735.2_5170-5188_s	5170-5188	AAAGCUCACUUUACUUAGA	1142	UCUAAGUAAAGUGAGCUUU	1711
NM_001735.2_5182-5200_s	5182-5200	ACUUAGAAUUAGUGGCACU	1143	AGUGCCACUAAUUCUAAGU	1712
NM_001735.2_5192-5210_s	5192-5210	AGUGGCACUUGCUUUUAUU	1144	AAUAAAAGCAAGUGCCACU	1713
NM_001735.2_5202-5220_s	5202-5220	GCUUUUAUUAGAGAAUGAU	1145	AUCAUUCUCUAAUAAAAGC	1714
NM_001735.2_5212-5230_s	5212-5230	GAGAAUGAUUUCAAUAGCU	1146	AGCAUUUGAAAUCAUUCUC	1715
NM_001735.2_5220-5238_s	5220-5238	UUUCAAAUGCUGUAACUUU	1147	AAAGUUACAGCAUUUGAAA	1716
NM_001735.2_5231-5249_s	5231-5249	GUAACUUUCUGAAUAACA	1148	UGUUAUUUCAGAAAGUUAC	1717
NM_001735.2_5241-5259_s	5241-5259	GAAAUACAUGGCCUUGGA	1149	UCCAAGGCCAUGUUUUUC	1718

NM_001735.2_5253-5271_s	5253-5271	CCUUGGAGGGCAUGAAGAC	1150	GUCUUCAUGCCCUCCAAGG	1719
NM_001735.2_5259-5277_s	5259-5277	AGGGCAUGAAGACAGAUAC	1151	GUAUCUGUCUUCAUGCCCU	1720
NM_001735.2_5273-5291_s	5273-5291	GAUACUCCUCCAAGGUUUAU	1152	AUAACCUUGGAGGAGUAUC	1721
NM_001735.2_5279-5297_s	5279-5297	CCUCCAAGGUUAUUGGACA	1153	UGUCCAAUAACCUUGGAGG	1722
NM_001735.2_5293-5311_s	5293-5311	GGACACCGGAAACAAUAAA	1154	UUUAUUGUUUCCGGUGUCC	1723
NM_001735.2_5301-5319_s	5301-5319	GAAACAAUAAAUUGGAACA	1155	UGUCCAAUUUAUUGUUUC	1724
NM_001735.2_5311-5329_s	5311-5329	AUUGGAACACCUCUCAAA	1156	UUUGAGGAGGUGUCCAAU	1725
NM_001735.2_5322-5340_s	5322-5340	UCCUCAAACCUACCACUCA	1157	UGAGUGGUAGGUUUGAGGA	1726
NM_001735.2_5331-5349_s	5331-5349	CUACCACUCAGGAAUGUUU	1158	AAACAUUCCUGAGUGGUAG	1727
NM_001735.2_5343-5361_s	5343-5361	AAUGUUUGCUGGGGCCGAA	1159	UUCGGCCCCAGCAAACAUU	1728
NM_001735.2_5349-5367_s	5349-5367	UGCUGGGGCCGAAAGAACA	1160	UGUUCUUUCGGCCCCAGCA	1729
NM_001735.2_5360-5378_s	5360-5378	AAAGAACAGUCCAUUGAAA	1161	UUUCA AUGGACUGUUCUUU	1730

NM_001735.2_5371-5389_s	5371-5389	CAUUGAAAGGGAGUAUUAC	1162	GUAUUACUCCCUUCAAUG	1731
NM_001735.2_5380-5398_s	5380-5398	GGAGUAUUACAAAAACAUG	1163	CAUGUUUUUGUAAUACUCC	1732
NM_001735.2_5391-5409_s	5391-5409	AAAACAUGGCCUUUGCUUG	1164	CAAGCAAAGGCCAUGUUUU	1733
NM_001735.2_5399-5417_s	5399-5417	GCCUUUGCUUGAAAGAAAA	1165	UUUUCUUUCAAGCAAAGGC	1734
NM_001735.2_5409-5427_s	5409-5427	GAAAGAAAAUACCAAGGAA	1166	UCCCUUGGUUUUUUCUUUC	1735
NM_001735.2_5420-5438_s	5420-5438	CCAAGGAACAGGAAACUGA	1167	UCAGUUUCCUGUCCUUGG	1736
NM_001735.2_5433-5451_s	5433-5451	AACUGAUCAUUAAAGCCUG	1168	CAGGCUUUAUGAUCAGUU	1737
NM_001735.2_5441-5459_s	5441-5459	AUUAAAGCCUGAGUUUGCU	1169	AGCAAACUCAGGCUUAAU	1738



### Пример 5: Сайленсинг C5 *in Vivo*

Группы из трех самок яванского макака обрабатывали C5-siRNA AD-58641 подкожно в лопаточную и среднюю часть спины в дозе 2,5 мг/кг или 5 мг/кг, или носителем в качестве контроля. Два круга схемы применения осуществляли в восемь доз в каждом круге, каждый третий день. C5 в сыворотке собирали и оценивали с помощью анализа ELISA, специфическом для обнаружения C5 (Abscam) в указанные моменты времени (фигура 13). Уровни C5 приводили к среднему из трех образцов до введения препарата. Образцы, собранные до введения препарата и на день 23 (через 24 часа после последней введенной дозы в первом круге лечения) подвергали биохимическому анализу сыворотки, гематологическому анализу и анализу на свертываемость.

Анализ уровня белка C5 в сыворотке по сравнению с уровнем белка C5 в сыворотке до лечения показал, что схема лечения с дозой 5 мг/кг AD-58641 привела к уменьшению уровня белка C5 в сыворотке до 98% (фигура 12). Средние уровни C5 в сыворотке были снижены на 97% в нижней точке, что указывает, что большинство циркулирующего C5 происходит из печени. Наблюдали дозозависимый эффект и длительный "нокдаун" уровня белка C5 в сыворотке при подкожным введением AD-58641. Никаких изменений в параметрах гематологии, биохимии сыворотки или коагуляции не было определено через 24 часа после первого круга схемы применения.

Гемолитическую активность сыворотки также анализировали с применением анализа сенсibilизированных эритроцитов барана для измерения активности классического пути. Процентную долю гемолиза рассчитывали по отношению максимального гемолиза к фоновому гемолизу в контрольных образцах. Средний индекс гемолиза +/- SEM для трех животных рассчитывали и анализировали (фигура 13). Гемолиз снизился до 94% в схеме лечения с дозой 5 мг/кг со средним значением ингибирования 92% в нижней точке. Снижение гемолиза поддерживалось в течение более чем двух недель после последней дозы.

### Пример 6: Скрининг Дополнительных siRNA *in Vitro*

Последовательности смысловой и антисмысловой цепей, представленные в таблице 20, модифицировали на 3'-конце короткой последовательностью дезокси-тимин нуклеотидов (dT) (таблица 21). Эффективность *in vitro* дуплексов, содержащих смысловую и антисмысловую последовательности, приведенные в таблице 21, определяли с помощью следующих способов.

#### *Клеточная культура и трансфекции*

Клетки Нер3В (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в EMEM (ATCC), дополненной 10% FBS (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 5 мкл Opti-MEM плюс 0,1мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. 40 мкл полных питательных сред, содержащих  $\sim 5 \times 10^3$  клеток Нер3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ.

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

Выделение РНК проводили с применением полуавтоматического анализатора Biotek EL 405 washer. Вкратце, клетки лизировали в 75 мкл лизирующего/связывающего буфера, содержащего 2мкл Dynabeads, затем смешивали в течение 10 минут при установке 7 электромагнитного шейкера (Union Scientific). Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 90 мкл промывочного буфера А, затем 90 мкл промывочного буфера В. Гранулы дважды промывали 100 мкл элюирующего буфера, который затем отсасывали и получали кДНК непосредственно на РНК, связанных с гранулами, в 384-луночном планшете.

*Синтез кДНК с использованием набора "ABI High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, Форстер-Сити,*

*Калифорния, № по кат. 4368813)*

Мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию добавляли непосредственно к РНК, связанных с гранулами, в 384-луночных планшетах, применяемых для выделения РНК. Затем планшеты встряхивали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут и затем помещали в инкубатор при 37°C в течение 2 часов. После этой инкубации планшеты помещали на шейкер в инкубаторе при 80°C в течение 7 минут для инактивации фермента и элюирования РНК/кДНК из гранул.

*PCR в режиме реального времени*

2 мкл кДНК добавляли к смеси мастер-микса, содержащей 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, номер по каталогу 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для C5 (Applied Biosystems, номер по каталогу Hs00156197\_M1) и 0,5 мкл зонда мастер-микс Lightcycler 480 (Roche, номер по каталогу 04887301001) в каждую лунку 384-луночного планшета (Roche, номер по каталогу 04887301001). PCR в режиме реального времени проводили в системе Roche LC480 Real Time PCR (Roche). Каждый дуплекс исследовали в по меньшей мере двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях.

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

Таблица 22 показывает результаты теста разовой дозы в клетках Her3В, трансфицированных указанными dT-модифицированными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося количества транскрипта по отношению к необработанным клеткам.

## dT-модифицированные иРНК С5

ID дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Положение в NM_001735.2	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:
AD-61779.2	UAUCCGUGGUUCCUGCUAdTdT	1739	3-21	UAGCAGGAAACCACGGAUAdTdT	2306
AD-61785.2	GGUUUCCUGCUACCUCCAAdTdT	1740	10-28	UUGGAGGUAGCAGGAAACCDTdT	2307
AD-61791.2	CCUCCAACCAUGGGCCUUUdTdT	1741	22-40	AAAGGCCCAUGGUUGGAGGdTdT	2308
AD-61797.2	GGGCCUUUUGGGAAUACUUdTdT	1742	33-51	AAGUAUUCSCAAAAGGCCdTdT	2309
AD-61803.2	GGAAUACUUUGUUUUUAAAdTdT	1743	43-61	UUAAAAACAAGUAUUCdTdT	2310
AD-61809.2	CUUUGUUUUUAAUCUUCdTdT	1744	49-67	GGAAGAUUAAAAACAAGdTdT	2311
AD-61815.2	CUUCCUGGGGAAAACCUGGdTdT	1745	63-81	CCAGGUUUUCCCCAGGAAGdTdT	2312
AD-61821.2	GGAAAACCUGGGGACAGGAdTdT	1746	71-89	UCCUGUCCCCAGGUUUUCdTdT	2313
AD-61780.2	GGGACAGGAGCAAACAUAUdTdT	1747	81-99	AUAUGUUUGCUCUCCUGUCCdTdT	2314
AD-61786.2	CAAACAUAUGUCAUUUCAGdTdT	1748	91-109	CUGAAAUGACAUAUGUUUGdTdT	2315
AD-61792.2	CAUUUCAGCACCAAAAUAAdTdT	1749	102-120	UAUUUUUGGUGCUGAAAUGdTdT	2316
AD-61798.2	GCACCAAAAUAUUCGUGdTdT	1750	109-127	CACGGAAUAUUUUUGGUGCdTdT	2317
AD-61804.2	CCGUGUUGGAGCAUCUGAAAdTdT	1751	123-141	UUCAGAUGCUCCAACACGGdTdT	2318
AD-61810.2	GGAGCAUCUGAAAAUAUUGdTdT	1752	130-148	CAAUAUUUCAGAUGCUCdTdT	2319
AD-61816.2	GAAAAUAUUGUGAUUCAAGdTdT	1753	139-157	CUUGAAUCACAAUAUUUCdTdT	2320
AD-61822.2	GAUUCAAGUUUAUGGAUACdTdT	1754	150-168	GUAUCCAUA AACUUGAAUCdTdT	2321
AD-61781.2	GGAUACACUGAAGCAUUUGdTdT	1755	163-181	CAA AUGCUUCAGUGUAUCdTdT	2322
AD-61787.2	GAAGCAUUUGAUGCAACAAdTdT	1756	172-190	UUGUUGCAUCAA AUGCUUCdTdT	2323

AD-61793.2	UGCAACAAUCUCUAUUAAAAdTdT	1757	183-201	UUUAAUAGAGAUUGUUGCAdTdT	2324
AD-61799.2	AAUCUCUAUUAAAAGUUAdTdT	1758	189-207	AUAACUUUUAAUAGAGAUUdTdT	2325
AD-61805.2	AAGUUAUCCUGAUAAAAAdTdT	1759	201-219	UUUUUUUUCAGGAUAACUdTdT	2326
AD-61811.2	CUGAUAAAAAUUUAGUUAdTdT	1760	209-227	UAACUAAAUUUUUUAUCAGdTdT	2327
AD-61817.2	UUAGUUACUCCUCAGGCCAdTdT	1761	221-239	UGGCCUGAGGAGUAACUAAdTdT	2328
AD-61823.2	CCUCAGGCCAUGUUCAUUdTdT	1762	230-248	AAAUGAACAUUGGCCUGAGGdTdT	2329
AD-61782.2	UUCAUUUAUCCUCAGAGAAAdTdT	1763	242-260	UUCUCUGAGGAUAAAUGAAAdTdT	2330
AD-61788.2	CUCAGAGAAUAAAUUCCAAdTdT	1764	252-270	UUGGAAUUUAUUCUCUGAGdTdT	2331
AD-61794.2	AAUAAAUCCAAAACUCUGdTdT	1765	259-277	CAGAGUUUUGGAAUUUAUdTdT	2332
AD-61800.2	CUCUGCAAUCUUAACAAUAdTdT	1766	273-291	UAUUGUUAAGAUUGCAGAGdTdT	2333
AD-61806.2	CUUAACAAUACAACCAAAAdTdT	1767	282-300	UUUUGGUUGUAUUGUUAAGdTdT	2334
AD-61812.2	CAACCAAACAAUUGCCUGdTdT	1768	292-310	CAGGCAAUUGUUUUGGUUGdTdT	2335
AD-61818.2	CAAUUGCCUGGAGGACAAAAdTdT	1769	301-319	UUUGUCCUCCAGGCAAUUGdTdT	2336
AD-61824.2	GGACAAAACCCAGUUUCUdTdT	1770	313-331	AAGAAACUGGGUUUUGUCCdTdT	2337
AD-61783.2	CCAGUUUCUUAUGUGUAUdTdT	1771	322-340	AAUACACAUAAAGAACUGGdTdT	2338
AD-61789.2	AUGUGUAUUUGGAAGUUGdTdT	1772	332-350	ACAACUCCAAAUACACAUdTdT	2339
AD-61795.2	GGAAGUUGUAUCAAGCAUdTdT	1773	342-360	AUGC UUUGAUACAACUCCdTdT	2340
AD-61801.2	GUAUCAAGCAUUUUUCAAdTdT	1774	349-367	UUGAAAAUUGC UUUGAUACdTdT	2341
AD-61807.2	UUUUCAAAUCAAAAAGAAAdTdT	1775	361-379	UUCUUUUUGAUUUUGAAAAdTdT	2342
AD-61813.2	CAAAAAGAAUGCCAUAACdTdT	1776	371-389	GUUAUUGGCAUUCUUUUUGdTdT	2343
AD-61819.2	GCCAAUAACCUAUGACAAUdTdT	1777	381-399	AUUGUCAUAGGUUAUUGGCdTdT	2344
AD-61825.2	CCUAUGACAAUGGAUUUCUdTdT	1778	389-407	AGAAAUCCAUUGUCAUAGGdTdT	2345

AD-61784.2	UGGAUUUCUCUUCAUUCAUdTdT	1779	399-417	AUGAAUGAAGAGAAAUCCAdTdT	2346
AD-61790.2	CAUUCAUACAGACAAACCUdTdT	1780	411-429	AGGUUUGUCUGUAUGAAUGdTdT	2347
AD-61796.2	CAGACAAACCUGUUUAUACdTdT	1781	419-437	GUAUAAACAGGUUUGUCUGdTdT	2348
AD-61802.2	GUUUUAUACUCCAGACCAGUdTdT	1782	430-448	ACUGGUCUGGAGUAUAAACdTdT	2349
AD-61808.2	AGACCAGUCAGUAAAAGUdTdT	1783	441-459	AACUUUUACUGACUGGUCUdTdT	2350
AD-61814.2	AGUAAAAGUUAGAGUUUAUdTdT	1784	450-468	AUAAACUCUAACUUUUACUdTdT	2351
AD-61820.2	AGAGUUUAUUCGUUGAAUGdTdT	1785	460-478	CAUUCAACGAAUAAACUCUdTdT	2352
AD-61826.2	CGUUGAAUGACGACUUGAAdTdT	1786	470-488	UUCAAGUCGUCAUUCAACGdTdT	2353
AD-61832.2	CUUGAAGCCAGCCAAAAGAdTdT	1787	483-501	UCUUUUGGCUGGCUUCAAGdTdT	2354
AD-61838.2	CCAGCCAAAAGAGAAACUGdTdT	1788	490-508	CAGUUUCUCUUUUGGCUGGdTdT	2355
AD-61844.2	AAACUGUCUUAACUUUCAUdTdT	1789	503-521	AUGAAAGUUAAGACAGUUUdTdT	2356
AD-61850.2	AACUUUCAUAGAUCUGAAdTdT	1790	513-531	UUCAGGAUCUAUGAAAGUdTdT	2357
AD-61856.2	CAUAGAUCUGAAGGAUCAdTdT	1791	519-537	UGAUCCUUCAGGAUCUAUGdTdT	2358
AD-61862.2	GAAGGAUCAGAAGUUGACAdTdT	1792	529-547	UGUCAACUUCUGAUCCUUCdTdT	2359
AD-61868.2	UGACAUGGUAGAAGAAAUdTdT	1793	543-561	AAUUUCUUCUACCAUGUCAdTdT	2360
AD-61827.2	GAAGAAUUGAUCUAUUGdTdT	1794	553-571	CAAUAUGAUCAAUUUCUUCdTdT	2361
AD-61833.2	GAUCAUAUUGGAAUUAUCUdTdT	1795	562-580	AGAUAUUCCAAUAUGAUCdTdT	2362
AD-61839.2	GGAAUUAUCUCUUUCCUGdTdT	1796	571-589	CAGGAAAAGAGAUAAUCCdTdT	2363
AD-61845.2	CUCUUUCCUGACUUCAAGdTdT	1797	579-597	CUUGAAGUCAGGAAAAGAGdTdT	2364
AD-61851.2	ACUUCAAGAUUCCGUCUAAdTdT	1798	590-608	UUAGACGGAAUCUUGAAGUdTdT	2365
AD-61857.2	CCGUCUAAUCCUAGAUUAGdTdT	1799	601-619	CAUAUCUAGGAUUGACGGdTdT	2366
AD-61863.2	CCUAGAUUUGGUAUGUGGAdTdT	1800	610-628	UCCACAUACCAUAUCUAGGdTdT	2367

AD-61869.2	UGUGGACGAUCAAGGCUAAdTdT	1801	623-641	UUAGCCUUGAUCGUCCACAdTdT	2368
AD-61828.2	CGAUCAAGGCUAAAUAUAAdTdT	1802	629-647	UUAUAUUUAGCCUUGAUCGdTdT	2369
AD-61834.2	AUAUAAAGAGGACUUUUCAdTdT	1803	642-660	UGAAAAGUCCUCUUUAUAUdTdT	2370
AD-61840.2	GAGGACUUUUCAACAACUGdTdT	1804	649-667	CAGUUGUUGAAAAGUCCUCdTdT	2371
AD-61846.2	CAACUGGAACCGCAUAUUUdTdT	1805	662-680	AAAUAUGCGGUUCCAGUUGdTdT	2372
AD-61852.2	CGCAUAUUUUGAAGUUAAAAdTdT	1806	672-690	UUUAACUUCAAAAUAUGCGdTdT	2373
AD-61858.2	AAGUUAAAGAAUAUGUCUUdTdT	1807	683-701	AAGACAUAUUCUUUAACUdTdT	2374
AD-61864.2	GAAUAUGUCUUGCCACAUUdTdT	1808	691-709	AAUGUGGCAAGACAUAUUCdTdT	2375
AD-61870.2	CCACAUUUUUCUGUCUCAAdTdT	1809	703-721	UUGAGACAGAAAAUGUGGdTdT	2376
AD-61829.2	CUGUCUCAAUUCGAGCCAGAdTdT	1810	713-731	UCUGGCUCGAUUGAGACAGdTdT	2377
AD-61835.2	CAAUCGAGCCAGAAUAUAAdTdT	1811	719-737	UUAUAUUCUGGCUCGAUUGdTdT	2378
AD-61841.2	GAAUAUAAUUUCAUUGGUUdTdT	1812	730-748	AACCAAUGAAAUAUAUUCdTdT	2379
AD-61847.2	AUUGGUUACAAGAACUUUAdTdT	1813	742-760	UAAAGUUCUUGUAACCAAUdTdT	2380
AD-61853.2	AGAACUUUAAGAAUUUUGAdTdT	1814	752-770	UCAAAAUUCUUAAGUUCUdTdT	2381
AD-61859.2	GAAUUUUGAAAUUACUAUAdTdT	1815	762-780	UAUAGUAAUUUCAAAAUUCdTdT	2382
AD-61865.2	GAAUUACUAUAAAAGCAAdTdT	1816	769-787	UUGCUIUUUAUAGUAAUUUCdTdT	2383
AD-61871.2	AAAGCAAGAUUUUUUAUAdTdT	1817	781-799	UAUAAAAUAUCUUGCUUUdTdT	2384
AD-61830.2	AUAUUUUUAUAAUAAAGUAdTdT	1818	789-807	UACUUUAUUAUAAAAUAUdTdT	2385
AD-61836.2	AAGUAGUCACUGAGGCUGAdTdT	1819	803-821	UCAGCCUCAGUGACUACUdTdT	2386
AD-61842.2	CACUGAGGCUGACGUUUAUdTdT	1820	810-828	AUAAACGUCAGCCUCAGUGdTdT	2387
AD-61848.2	CGUUUAUAUCACAUUUGGAdTdT	1821	822-840	UCCAAAUGUGAUUAACGdTdT	2388
AD-61854.2	CACAUUUGGAAUAAGAGAAAdTdT	1822	831-849	UUCUCUUAUCCAAAUGUGdTdT	2389

AD-61860.2	AAUAAGAGAAGACUAAAAAdTdT	1823	840-858	UUUUAAGUCUUCUCUUAUdTdT	2390
AD-61866.2	CUUAAAAGAUGAUCAAAAAdTdT	1824	852-870	UUUUUGAUCaucUUUUAAGdTdT	2391
AD-61872.2	GAUGAUCAAAAAGAAUGAdTdT	1825	859-877	UCAUUUCUUUUGAUCaucdTdT	2392
AD-61831.2	AAAUGAUGCAAACAGCAAUdTdT	1826	872-890	AUUGCUGUUUGCAUCAUUdTdT	2393
AD-61837.2	ACAGCAAUGCAAACACAAdTdT	1827	883-901	UUGUGUUUUGCAUUGCUGUdTdT	2394
AD-61843.2	AAAACACAAUGUUGAUAAAAdTdT	1828	893-911	UUUAUCAACAuUGUGUUUdTdT	2395
AD-61849.2	CAAUGUUGAUAAAUGGAAUdTdT	1829	899-917	AUCCAUUUAUCAACAuUGdTdT	2396
AD-61855.2	GGAAUUGCUCaAGUCACAuTdTdT	1830	913-931	AUGUGACUUGAGCAAUCCdTdT	2397
AD-61861.2	GCUCAAGUCACAuuUGAUUdTdT	1831	919-937	AAUCAAAUGUGACUUGAGCdTdT	2398
AD-61867.2	AUUUGAUUCUGAAACAGCAdTdT	1832	930-948	UGCUGUUUCAGAAUCAAAUdTdT	2399
AD-62062.1	UGAAACAGCAGUCAAAAGAAAdTdT	1833	939-957	UUCUUUGACUGCUGUUUCAdTdT	2400
AD-62068.1	CAAAGAACUGUCAUACUACdTdT	1834	951-969	GUAGUAUGACAGUUCUUUGdTdT	2401
AD-62074.1	CAUACUACAGUUUAGAAGAdTdT	1835	962-980	UCUUCUAAACUGUAGUAUGdTdT	2402
AD-62080.1	CAGUUUAGAAGAUUUAAACdTdT	1836	969-987	GUUUAUAUCUUCUAAACUGdTdT	2403
AD-62086.1	UAAACAACAAGUACCUUUAdTdT	1837	983-1001	UAAAGGUACUUGUUGUUUAdTdT	2404
AD-62092.1	CAAGUACCUUUUAUuUGCUdTdT	1838	990-1008	AGCAAUAUAAGGUACUUGdTdT	2405
AD-62098.1	UAUUGCUGUAACAGUCAUAdTdT	1839	1002-1020	UAUGACUGUUACAGCAAUAdTdT	2406
AD-62104.1	AACAGUCAUAGAGUCUACAdTdT	1840	1011-1029	UGUAGACUCUAUGACUGUUdTdT	2407
AD-62063.1	AGAGUCUACAGGUGGAUUUdTdT	1841	1020-1038	AAAUCCACCUGUAGACUCUdTdT	2408
AD-62069.1	GGAUUUCUGAAGAGGCAGdTdT	1842	1033-1051	CUGCCUCUUCAGAAAuCCdTdT	2409
AD-62075.1	GAAGAGGCAGAAUACCUGdTdT	1843	1042-1060	CAGGUAUUUCUGCCUCUUCdTdT	2410
AD-62081.1	AGAAAUACCUGGCAUCAAAAdTdT	1844	1050-1068	UUUGAUGCCAGGUUUUCUdTdT	2411



AD-62087.1	GCAUCAAAUAUGUCCUCUCdTdT	1845	1061-1079	GAGAGGACAUAAUUGAUGCdTdT	2412
AD-62093.1	UGUCCUCUCUCCCUACAAAdTdT	1846	1071-1089	UUUGUAGGGAGAGAGGACAdTdT	2413
AD-62099.1	GAAUUUGGUUGCUCUCCUdTdT	1847	1092-1110	AGGAGUAGCAACCAAUUCdTdT	2414
AD-62105.1	GCUACUCCUCUUUCCUGAdTdT	1848	1102-1120	UCAGGAAAAGAGGAGUAGCdTdT	2415
AD-62064.1	CUCUUUCCUGAAGCCUGGdTdT	1849	1109-1127	CCAGGCUUCAGGAAAAGAGdTdT	2416
AD-62070.1	CCUGGGAUUCCAUAUCCCAAdTdT	1850	1123-1141	UGGGAUAUGGAAUCCCAGGdTdT	2417
AD-62076.1	CAUAUCCCAUCAAGGUGCAdTdT	1851	1133-1151	UGCACCUUGAUGGGAUUAUGdTdT	2418
AD-62082.1	CCAUCAAGGUGCAGGUAAAdTdT	1852	1139-1157	UUAACCUGCACCUUGAUGGdTdT	2419
AD-62088.1	CAGGUUAAAGAUUCGCUUGdTdT	1853	1150-1168	CAAGCGAAUCUUUAACCUGdTdT	2420
AD-62094.1	UUCGCUUGACCAGUUGGUAdTdT	1854	1161-1179	UACCAACUGGUCAAGCGAAAdTdT	2421
AD-62100.1	CCAGUUGGUAGGAGGAGUCdTdT	1855	1170-1188	GACUCCUCCUACCAACUGGdTdT	2422
AD-62106.1	GGAGGAGUCCCAGUAACACdTdT	1856	1180-1198	GUGUUACUGGGACUCCUCCdTdT	2423
AD-62065.1	CAGUAACACUGAAUGCACAdTdT	1857	1190-1208	UGUGCAUUCAGUGUUACUGdTdT	2424
AD-62071.1	GAAUGCACAAACAAUUGAUdTdT	1858	1200-1218	AUCAAUUGUUUGUGCAUUCdTdT	2425
AD-62077.1	AACAAUUGAUGUAAACCAAdTdT	1859	1209-1227	UUGGUUUACAUCAAUUGUAdTdT	2426
AD-62083.1	UAAACCAAGAGACAUCUGAdTdT	1860	1220-1238	UCAGAUGUCUCUUGGUUUAdTdT	2427
AD-62089.1	CAUCUGACUUGGAUCCAAGdTdT	1861	1232-1250	CUUGGAUCCAAGUCAGAUGdTdT	2428
AD-62095.1	GAUCCAAGCAAAGUGUAAAdTdT	1862	1243-1261	UUACACUUUUGCUUGGAUCdTdT	2429
AD-62101.1	CAAAGUGUAAACACGUGUAdTdT	1863	1251-1269	AACACGUGUUACACUUUUGdTdT	2430
AD-62107.1	AACACGUGUUGAUGAUGGAdTdT	1864	1260-1278	UCCAUCAUCAACACGUGUAdTdT	2431
AD-62066.1	UGAUGGAGUAGCUUCCUUAdTdT	1865	1272-1290	AAAGGAAGCUACUCCAUCAdTdT	2432
AD-62072.1	GUAGCUUCCUUUGUGCUUAdTdT	1866	1279-1297	UAAGCACAAAGGAAGCUACdTdT	2433

AD-62078.1	GCUUAAUCUCCCAUCUGGAdTdT	1867	1293-1311	UCCAGAUGGGAGAUUAAGCdTdT	2434
AD-62084.1	CCAUCUGGAGUGACGGUGCdTdT	1868	1303-1321	GCACCGUCACUCCAGAUGGdTdT	2435
AD-62090.1	UGACGGUGCUGGAGUUUAAdTdT	1869	1313-1331	UUAAACUCCAGCACCGUCAdTdT	2436
AD-62096.1	GCUGGAGUUUAAUGUCAAAAdTdT	1870	1320-1338	UUUGACAUUAAACUCCAGCdTdT	2437
AD-62102.1	UGUCAAAACUGAUGCUCAdTdT	1871	1332-1350	UGGAGCAUCAGUUUUGACAdTdT	2438
AD-62108.1	GAUGCUC CAGAUCUCCAGdTdT	1872	1342-1360	CUGGAAGAUCUGGAGCAUCdTdT	2439
AD-62067.1	CAGAUCUCCAGAAGAAAAdTdT	1873	1349-1367	UUUUCUUCUGGAAGAUCUGdTdT	2440
AD-62073.1	AGAAAUCAGGCCAGGGAAAdTdT	1874	1362-1380	UUCCCUGGCCUGAUUUUCUdTdT	2441
AD-62079.1	GGCCAGGGAAGGUUACCGAdTdT	1875	1371-1389	UCGGUAACCUUCCCUGGCCdTdT	2442
AD-62085.1	GUUACCGAGCAAUAGCAUAdTdT	1876	1382-1400	UAUGCUAUUGCUCGGUAACdTdT	2443
AD-62091.1	AUAGCAUACUCAUCUCUCAdTdT	1877	1393-1411	UGAGAGAUGAGUAUGCUAUdTdT	2444
AD-62097.1	UACUCAUCUCUCAGCCAAAAdTdT	1878	1399-1417	UUUGGCUGAGAGAUGAGUAdTdT	2445
AD-62103.1	GCCAAAGUUACCUUUAUAdTdT	1879	1412-1430	AUAUAAAGGUAACUUUGGCdTdT	2446
AD-62109.1	CCUUUAUUAUGAUUGGACUdTdT	1880	1422-1440	AGUCCAAUCAAUUAAAGGdTdT	2447
AD-62115.1	GAUUGGACUGAUAAACCAUAdTdT	1881	1432-1450	UAUGGUUAUCAGUCCAAUCdTdT	2448
AD-62121.1	CUGAUAAACCAUAAGGCUUdTdT	1882	1439-1457	AAAGCCUUAUGGUUAUCAGdTdT	2449
AD-62127.1	AGGCUUUGC UAGUGGGAGAdTdT	1883	1451-1469	UCUCCCACUAGCAAAGCCUdTdT	2450
AD-62133.1	GUGGGAGAACAUCUGAAUAdTdT	1884	1462-1480	UAUUCAGAUGUUCUCCCACdTdT	2451
AD-62139.1	CAUCUGAAUUAUUGUUAdTdT	1885	1471-1489	UAACAAUAAUUAUCAGAUGdTdT	2452
AD-62145.1	UAUUAUUGUUACCCCAAAAdTdT	1886	1479-1497	UUUGGGGUAAACAAUAAUAdTdT	2453
AD-62151.1	CCCAAAGCCCAUUAUUGdTdT	1887	1492-1510	CAUAUAUUGGGCUUUUGGdTdT	2454
AD-62110.1	CCAAAAGCCCAUUAUUGAdTdT	1888	1493-1511	UCAUAUAUUGGGCUUUUGGdTdT	2455

AD-62116.1	CAAAAGCCCAUUAUUGACdTdT	1889	1494-1512	GUCAAUAUAUGGGCUUUUGdTdT	2456
AD-62122.1	AAAAGCCCAUUAUUGACAdTdT	1890	1495-1513	UGUCAAUUAUGGGCUUUUdTdT	2457
AD-62128.1	AAAGCCCAUUAUUGACAAdTdT	1891	1496-1514	UUGUCAAUUAUGGGCUUUdTdT	2458
AD-62134.1	AAGCCCAUUAUUGACAAAdTdT	1892	1497-1515	UUUGUCAAUUAUGGGCUUdTdT	2459
AD-62140.1	AGCCCAUUAUUGACAAAAdTdT	1893	1498-1516	UUUUGUCAAUUAUGGGCUdTdT	2460
AD-62146.1	GCCCAUUAUUGACAAAAdTdT	1894	1499-1517	AUUUUGUCAAUUAUGGGCdTdT	2461
AD-62152.1	CCCAUUAUUGACAAAAdTdT	1895	1500-1518	UAUUUUGUCAAUUAUGGGdTdT	2462
AD-62111.1	CCAUUAUUGACAAAUAAdTdT	1896	1501-1519	UUUUUUGUCAAUUAUGGdTdT	2463
AD-62117.1	CAUUAUUGACAAAUAACdTdT	1897	1502-1520	GUUUUUUGUCAAUUAUGdTdT	2464
AD-62123.1	AUAUUAUUGACAAAUAACUdTdT	1898	1503-1521	AGUUUUUUGUCAAUUAUdTdT	2465
AD-62129.1	UAUAUUGACAAAUAACUCdTdT	1899	1504-1522	GAGUUUUUUGUCAAUUAAdTdT	2466
AD-62135.1	AUAUUGACAAAUAACUCAdTdT	1900	1505-1523	UGAGUUUUUUGUCAAUUdTdT	2467
AD-62141.1	UAUUGACAAAUAACUCACdTdT	1901	1506-1524	GUGAGUUUUUUGUCAAUAdTdT	2468
AD-62147.1	AUUGACAAAUAACUCACUdTdT	1902	1507-1525	AGUGAGUUUUUUGUCAAUdTdT	2469
AD-62153.1	UUGACAAAUAACUCACUAdTdT	1903	1508-1526	UAGUGAGUUUUUUGUCAAdTdT	2470
AD-62112.1	UGACAAAUAACUCACUAUdTdT	1904	1509-1527	AUAGUGAGUUUUUUGUCAdTdT	2471
AD-62118.1	GACAAAUAACUCACUAUAdTdT	1905	1510-1528	UAUAGUGAGUUUUUUGUCdTdT	2472
AD-62124.1	AAAUAACUCACUAUAAUdTdT	1906	1513-1531	AAUUUAUAGUGAGUUUUUdTdT	2473
AD-62130.1	AAUAACUCACUAUAAUAdTdT	1907	1514-1532	UAAUUUAUAGUGAGUUUUUdTdT	2474
AD-62136.1	AAUAACUCACUAUAAUACdTdT	1908	1515-1533	GUAUUUAUAGUGAGUUUUdTdT	2475
AD-62142.1	AUAACUCACUAUAAUACUdTdT	1909	1516-1534	AGUAAUUUAUAGUGAGUUUdTdT	2476
AD-62148.1	AACUCACUAUAAUACUUGdTdT	1910	1518-1536	CAAGUAAUUUAUAGUGAGUUdTdT	2477

AD-62154.1	ACUCACUAUAAUACUUGAdTdT	1911	1519-1537	UCAAGUAAUUUAGUGAGUdTdT	2478
AD-62113.1	CUCACUAUAAUACUUGAUdTdT	1912	1520-1538	AUCAAGUAAUUUAGUGAGdTdT	2479
AD-62119.1	UCACUAUAAUACUUGAUUdTdT	1913	1521-1539	AAUCAAGUAAUUUAGUGAdTdT	2480
AD-62125.1	ACUAUAAUACUUGAUUUUdTdT	1914	1523-1541	AAAAUCAAGUAAUUUAGUdTdT	2481
AD-62131.1	CUAUAAUACUUGAUUUUAdTdT	1915	1524-1542	UAAAAUCAAGUAAUUUAGdTdT	2482
AD-62137.1	UAUAAUACUUGAUUUUAdTdT	1916	1525-1543	AUAAAAUCAAGUAAUUUAdTdT	2483
AD-62143.1	AUAAUACUUGAUUUUAUCdTdT	1917	1526-1544	GAUAAAAUCAAGUAAUUUdTdT	2484
AD-62149.1	UAAUACUUGAUUUUAUCCdTdT	1918	1527-1545	GGAUAAAAUCAAGUAAUUAdTdT	2485
AD-62155.1	AAUACUUGAUUUUAUCCAdTdT	1919	1528-1546	UGGAUAAAAUCAAGUAAUUdTdT	2486
AD-62114.1	AUUACUUGAUUUUAUCCAAdTdT	1920	1529-1547	UUGGAUAAAAUCAAGUAAUdTdT	2487
AD-62120.1	UUAUCCAAGGGCAAAAUAdTdT	1921	1540-1558	UAAUUUUGCCCUUGGAUAAAdTdT	2488
AD-62126.1	GCAAAUUAUCCACUUUGGdTdT	1922	1550-1568	CCAAAGUGGAUAAUUUUGCdTdT	2489
AD-62132.1	CACUUUGGCACGAGGGAGAdTdT	1923	1561-1579	UCUCCCUCGUGCCAAAGUGdTdT	2490
AD-62138.1	CGAGGGAGAAUUUUCAGAdTdT	1924	1571-1589	UCUGAAAAUUUCUCCCUCGdTdT	2491
AD-62144.1	AUUUUCAGAUGCAUCUUAUdTdT	1925	1581-1599	AUAAGAUGCAUCUGAAAAUdTdT	2492
AD-62150.1	GCAUCUUAUCAAGUAUAAdTdT	1926	1591-1609	UUAUACUUGAUAGAUGCdTdT	2493
AD-62156.1	CAAAGUAUAACAUAUCCAGdTdT	1927	1600-1618	CUGGAAUGUUUAUACUUUGdTdT	2494
AD-62162.1	AUCCAGUAACACAGAACAdTdT	1928	1612-1630	UGUUCUGUGUACUGGAAUdTdT	2495
AD-62168.1	CACAGAACAUGGUCCUUCdTdT	1929	1622-1640	GAAGGAACCAUGUUCUGUGdTdT	2496
AD-62174.1	GGUCCUUCAUCCCGACUdTdT	1930	1632-1650	AAGUCGGGAUGAAGGAACCDdTdT	2497
AD-62180.1	CCCGACUUCUGGUCUAUUAdTdT	1931	1643-1661	UAAUAGACCAGAAGUCGGGdTdT	2498
AD-62186.1	GGUCUAUUACAUCGUCACAdTdT	1932	1653-1671	UGUGACGAUGUAAUAGACCDdTdT	2499

AD-62192.1	AUCGUCACAGGAGAACAGAdTdT	1933	1663-1681	UCUGUUCUCCUGUGACGAUdTdT	2500
AD-62198.1	CAGGAGAACAGACAGCAGAdTdT	1934	1670-1688	UCUGCUGUCUGUUCUCCUGdTdT	2501
AD-62157.1	CAGCAGAAUUAGUGUCUGAdTdT	1935	1682-1700	UCAGACACUAAUUCUGCUGdTdT	2502
AD-62163.1	GUGUCUGAUUCAGUCUGGUdTdT	1936	1693-1711	ACCAGACUGAAUCAGACACdTdT	2503
AD-62169.1	CAGUCUGGUUAAAUAUUGAdTdT	1937	1703-1721	UCAAUUUUAACCAGACUGdTdT	2504
AD-62175.1	GUUAAAUAUUGAAGAAAAAdTdT	1938	1710-1728	UUUUUCUCAAUAUUUAACdTdT	2505
AD-62181.1	AGAAAAAUGUGGCAACCAGdTdT	1939	1722-1740	CUGGUUGCCACAUUUUUCUdTdT	2506
AD-62187.1	GCAACCAGCUCCAGGUUCAdTdT	1940	1733-1751	UGAACCUGGAGCUGGUUGCdTdT	2507
AD-62193.1	GCUCCAGGUUCAUCUGUCUdTdT	1941	1740-1758	AGACAGAUGAACCUGGAGCdTdT	2508
AD-62199.1	AUCUGUCUCCUGAUGCAGAdTdT	1942	1751-1769	UCUGCAUCAGGAGACAGAUdTdT	2509
AD-62158.1	GAUGCAGAUGCAUAUUCUCdTdT	1943	1762-1780	GAGAAUAUGCAUCUGCAUCdTdT	2510
AD-62164.1	GCAUAUUCUCCAGGCCAAAAdTdT	1944	1771-1789	UUUGGCCUGGAGAAUAUGCdTdT	2511
AD-62170.1	AGGCCAAACUGUGUCUCUdTdT	1945	1782-1800	AAGAGACACAGUUUGGCCUdTdT	2512
AD-62176.1	GUGUCUCUAAUAUGGCAAdTdT	1946	1792-1810	UUGCCAUAUUAAGAGACACdTdT	2513
AD-62182.1	UUAAUAUGGCAACUGGAAUdTdT	1947	1799-1817	AUUC CAGUUGCCAUAUUAAdTdT	2514
AD-62188.1	AACUGGAAUGGAUUCUGGdTdT	1948	1809-1827	CCAGGAAUCCAUUC CAGUdTdT	2515
AD-62194.1	UUC CUGGGUGGCAUUAGCAdTdT	1949	1821-1839	UGC UAAUGCCACCCAGGAAAdTdT	2516
AD-62200.1	GGCAUUAGCAGCAGUGGACdTdT	1950	1830-1848	GUCCACUGCUGCUAAUGCCdTdT	2517
AD-62159.1	AGUGGACAGUGCUGUGUAUdTdT	1951	1842-1860	AUACACAGCACUGUCCACUdTdT	2518
AD-62165.1	GCUGUGUAUGGAGUCCAAAAdTdT	1952	1852-1870	UUUGGACUCCAUAACACAGCdTdT	2519
AD-62171.1	AGUCCAAAGAGGAGCCAAAAdTdT	1953	1863-1881	UUUGGCUC CUCUUGGACUdTdT	2520
AD-62177.1	AGAGGAGCCAAAAGCCCUdTdT	1954	1870-1888	AGGGCUUUUUGGCUC CUCUdTdT	2521

AD-62183.1	AGCCCUUGGAAAGAGUAUdTdT	1955	1883-1901	AAUACUCUUCCAAGGGCudTdT	2522
AD-62189.1	AAGAGUAUUUCAAUUCUAdTdT	1956	1893-1911	UAAGAAUUGAAAUACUCUdTdT	2523
AD-62195.1	UUUCAAUUCUAGAGAAGAdTdT	1957	1900-1918	UCUUCUCUAAGAAUUGAAAdTdT	2524
AD-62201.1	GAGAAGAGUGAUCUGGGCudTdT	1958	1912-1930	AGCCCAGAUCACUCUUCUCdTdT	2525
AD-62160.1	UGAUCUGGGCUGUGGGGCAdTdT	1959	1920-1938	UGCCCCACAGCCCAGAUcAdTdT	2526
AD-62166.1	GGGGCAGGUGGUGGCCUCAdTdT	1960	1933-1951	UGAGGCCACCACCUGCCCCdTdT	2527
AD-62172.1	GUGGCCUCAACAAUGCCAAdTdT	1961	1943-1961	UUGGCAUUGUUGAGGCCACdTdT	2528
AD-62178.1	CAACAAUGCCAAUGUGUUCdTdT	1962	1950-1968	GAACACAUUGGCAUUGUUGdTdT	2529
AD-62184.1	CAAUGUGUCCACCUAGCUdTdT	1963	1959-1977	AGCUAGGUGGAACACAUUGdTdT	2530
AD-62190.1	CACCUAGCUGGACUUAACCUdTdT	1964	1969-1987	AGGUAAGUCCAGCUAGGUGdTdT	2531
AD-62196.1	GACUUACCUUCCUCACUAAAdTdT	1965	1979-1997	UUAGUGAGGAAGGUAAGUCdTdT	2532
AD-62202.1	UCACUAAUGCAAAUGCAGAdTdT	1966	1991-2009	UCUGCAUUUGCAUUAGUGAdTdT	2533
AD-62161.1	AAAUGCAGAUGACUCCCAAdTdT	1967	2001-2019	UUGGGAGUCAUCUGCAUUdTdT	2534
AD-62167.1	CUCCAAGAAAUGAUGAAAdTdT	1968	2013-2031	UUCAUCAUUUCUUGGGAGdTdT	2535
AD-62173.1	CCUUGUAAAGAAUUCUCAdTdT	1969	2032-2050	UGAGAAUUCUUACAAGGdTdT	2536
AD-62179.1	AAUUCUCAGGCCAAGAAGAdTdT	1970	2043-2061	UCUUCUUGGCCUGAGAAUdTdT	2537
AD-62185.1	CCAAGAAGAACGCUGCAAAdTdT	1971	2053-2071	UUUGCAGCGUUCUUCUUGGdTdT	2538
AD-62191.1	CGCUGCAAAAGAAGAUAGAdTdT	1972	2063-2081	UCUAUCUUCUUUGCAGCGdTdT	2539
AD-62197.1	AAAGAAGAUAGAAGAAUAdTdT	1973	2070-2088	UAUUUCUUCUAUCUUCUUdTdT	2540
AD-62203.1	AGAAAUAGCUGCUAAAUAdTdT	1974	2082-2100	AUAUUUAGCAGCUAUUUCUdTdT	2541
AD-62209.1	GCUGCUAAAUUAUAACAAdTdT	1975	2089-2107	AAUGUUUAUAUUUAGCAGCdTdT	2542
AD-62215.1	ACAUUCAGUAGUGAAGAAAdTdT	1976	2103-2121	UUUCUUCACUACUGAAUGUdTdT	2543

AD-62221.1	GUAGUGAAGAAAUGUUGUdTdT	1977	2110-2128	AACAACAUUUCUUCACUACdTdT	2544
AD-62227.1	AAAUGUUGUUACGAUGGAGdTdT	1978	2119-2137	CUCCAUCGUAACAACAUUUdTdT	2545
AD-62233.1	CGAUGGAGCCUGCGUUAUdTdT	1979	2130-2148	AUUAACGCAGGCUCCAUCGdTdT	2546
AD-62239.1	CGUUAUAUGAUGAAACdTdT	1980	2142-2160	GGUUUCAUCAUUAUUAACGdTdT	2547
AD-62245.1	AUGAUGAAACCUGUGAGCAdTdT	1981	2150-2168	UGCUCACAGGUUCAUCAUdTdT	2548
AD-62204.1	CUGUGAGCAGCGAGCUGCAdTdT	1982	2160-2178	UGCAGCUCGCUGCUCACAGdTdT	2549
AD-62210.1	CGAGCUGCACGGAUUAGUdTdT	1983	2170-2188	AACUAAUCCGUGCAGCUCGdTdT	2550
AD-62216.1	GGAUUAGUUAGGGCCAAGdTdT	1984	2180-2198	CUUGGCCCUAAACUAAUCCdTdT	2551
AD-62222.1	GGCCAAGAUGCAUCAAGdTdT	1985	2191-2209	CUUUGAUGCAUCUUGGCCdTdT	2552
AD-62228.1	CAUCAAGCUUUCACUGAAAdTdT	1986	2202-2220	UUCAGUGAAAGCUUGAUGdTdT	2553
AD-62234.1	GCUUUCACUGAAUGUUGUGdTdT	1987	2209-2227	CACAACAUUCAGUGAAAGCdTdT	2554
AD-62240.1	AAUGUUGUGUCGUCGCAAGdTdT	1988	2219-2237	CUUGCGACGACACAACAUdTdT	2555
AD-62246.1	CGUCGCAAGCCAGCUCCGUdTdT	1989	2229-2247	ACGGAGCUGGCUUGCGACGdTdT	2556
AD-62205.1	GCUCCGUGC UAAUAUCUCUdTdT	1990	2241-2259	AGAGAUUAGCACGGAGCdTdT	2557
AD-62211.1	CUAAUAUCUCUCAUAAAGAdTdT	1991	2249-2267	UCUUUAUGAGAGAUUUAGdTdT	2558
AD-62217.1	AAAGACAUGCAAUUGGGAAdTdT	1992	2263-2281	UCCCCAAUUGCAUGUCUUdTdT	2559
AD-62223.1	CAAUUGGGAAGGCUACACAdTdT	1993	2272-2290	UGUGUAGCCUCCCCAAUUGdTdT	2560
AD-62229.1	GCUACACAUGAAGACCCUGdTdT	1994	2283-2301	CAGGGUCUUCAUGUGUAGCdTdT	2561
AD-62235.1	CAUGAAGACCCUGUUACCAdTdT	1995	2289-2307	UGGUAACAGGGUCUUCAUGdTdT	2562
AD-62241.1	UACCAGUAAGCAAGCCAGAdTdT	1996	2303-2321	UCUGGCUUGCUUACUGGUAdTdT	2563
AD-62247.1	AGCAAGCCAGAAUUCGGAdTdT	1997	2311-2329	UCCGAAUUCUGGCUUGCdTdT	2564
AD-62206.1	AGAAUUCGGAGUUUUUdTdT	1998	2319-2337	AAAAUAACUCCGAAUUUCUdTdT	2565

AD-62212.1	AGUUUUUUUCCAGAAAGCudTdT	1999	2329-2347	AGCUUUCUGGAAAAUAACudTdT	2566
AD-62218.1	CAGAAAGCUGGUUGUGGGAdTdT	2000	2339-2357	UCCACAACCAGCUUUCUGdTdT	2567
AD-62224.1	GUGGGAAGUUCAUCUUGUudTdT	2001	2352-2370	AACAAGAUGAACUCCCACdTdT	2568
AD-62230.1	UCAUCUUGUUC CAGAAGAdTdT	2002	2361-2379	UCUUCUGGGAACAAGAUGAdTdT	2569
AD-62236.1	CCAGAAGAAAACAGUUGCAdTdT	2003	2372-2390	UGCAACUGUUUUCUUCUGGdTdT	2570
AD-62242.1	CAGUUGCAGUUUGCCCUACdTdT	2004	2383-2401	GUAGGGCAAACUGCAACUGdTdT	2571
AD-62248.1	CAGUUUGCCCUACCUGAUUdTdT	2005	2389-2407	AAUCAGGUAGGGCAAACUGdTdT	2572
AD-62207.1	CCUGAUUCUCUAACCACCUdTdT	2006	2401-2419	AGGUGGUUAGAGAAUCAGGdTdT	2573
AD-62213.1	ACCACCUGGGAAAUUCAAGdTdT	2007	2413-2431	CUUGAAUUUCCAGGUGGUdTdT	2574
AD-62219.1	GAAAUUCAAGGCGUUGGCAdTdT	2008	2422-2440	UGCCAACGCCUUGAAUUUCdTdT	2575
AD-62225.1	CGUUGGCAUUUCAACACUdTdT	2009	2433-2451	AGUGUUUGAAAUGCCAACGdTdT	2576
AD-62231.1	CAUUUCAAAACACUGGUUAUAdTdT	2010	2439-2457	UAUACCAGUGUUUGAAAUGdTdT	2577
AD-62237.1	GUAUAUGUGUUGCUGAUACdTdT	2011	2453-2471	GUAUCAGCAACACAUAUACdTdT	2578
AD-62243.1	UGCUGAUACUGUCAAGGCAdTdT	2012	2463-2481	UGCCUUGACAGUAUCAGCAdTdT	2579
AD-62249.1	CUGUCAAGGCAAAGGUGUudTdT	2013	2471-2489	AACACCUUUGCCUUGACAGdTdT	2580
AD-62208.1	AGGUGUUC AAGAUGUCUudTdT	2014	2483-2501	AAGACAUCUUUGAACACCUdTdT	2581
AD-62214.1	CAAAGAUGUCUCCUGGAAAdTdT	2015	2490-2508	UCCAGGAAGACAUCUUUGdTdT	2582
AD-62220.1	CUUCCUGGAAAUGAAUAUAdTdT	2016	2499-2517	UAUAUUCAUUCCAGGAAGdTdT	2583
AD-62226.1	GAAUAUACCAUAUUCUGUudTdT	2017	2511-2529	AACAGAAUAUGGUUAUAUUCdTdT	2584
AD-62232.1	AUAUUCUGUUGUACGAGGAdTdT	2018	2520-2538	UCCUCGUACAACAGAAUAUdTdT	2585
AD-62238.1	CGAGGAGAACAGAUCCA AUdTdT	2019	2533-2551	AUUGGAUCUGUUCUCCUCGdTdT	2586
AD-62244.1	GAACAGAUCCA AUUGAAAGdTdT	2020	2539-2557	CUUUCAAUUGGAUCUGUUCdTdT	2587



AD-61874.1	GAAAGGAACUGUUUACAACdTdT	2021	2553-2571	GUUGUAAACAGUUCCUUUCdTdT	2588
AD-61880.1	ACUGUUUACAACUAUAGGAdTdT	2022	2560-2578	UCCUAUAGUUGUAAACAGUdTdT	2589
AD-61886.1	AACUAUAGGACUUCUGGGAdTdT	2023	2569-2587	UCCCAGAAGUCCUAUAGUUdTdT	2590
AD-61892.1	UGGGAUGCAGUUCUGUGUUdTdT	2024	2583-2601	AACACAGAACUGCAUCCAdTdT	2591
AD-61898.1	GUUCUGUGUUAAAAUGUCUdTdT	2025	2592-2610	AGACAUUUUAACACAGAACdTdT	2592
AD-61904.1	UUAAAAUGUCUGCUGUGGAdTdT	2026	2600-2618	UCCACAGCAGACAUUUUAAAdTdT	2593
AD-61910.1	CUGUGGAGGGAAUCUGCACdTdT	2027	2612-2630	GUGCAGAUUCCCUCCACAGdTdT	2594
AD-61916.1	GGAAUCUGCACUUCGAAAAdTdT	2028	2620-2638	UUUCCGAAGUGCAGAUUCCdTdT	2595
AD-61875.1	CGGAAAGCCCAGUCAUUGAdTdT	2029	2633-2651	UCAAUGACUGGGCUUUCGdTdT	2596
AD-61881.1	CCAGUCAUUGAUCAUCAGGdTdT	2030	2641-2659	CCUGAUGAUCAAUGACUGGdTdT	2597
AD-61887.1	CAUCAGGGCACAAAGUCCUdTdT	2031	2653-2671	AGGACUUUGUGCCCUGAUGdTdT	2598
AD-61893.1	GGCACAAAGUCCUCCAAAUdTdT	2032	2659-2677	AUUUGGAGGACUUUGUGCCdTdT	2599
AD-61899.1	CAA AUGUGUGCGCCAGAAAAdTdT	2033	2673-2691	UUUCUGGCGCACACAUUUGdTdT	2600
AD-61905.1	GCGCCAGAAAGUAGAGGGC dTdT	2034	2682-2700	GCCCUACUUUCUGGCGC dTdT	2601
AD-61911.1	AGUAGAGGGCUCCUCCAGUdTdT	2035	2691-2709	ACUGGAGGAGCCCUACUdTdT	2602
AD-61917.1	CCUCCAGUCACUUGGUGACdTdT	2036	2702-2720	GUCACCAAGUGACUGGAGGdTdT	2603
AD-61876.1	UCACUUGGUGACAUUCACUdTdT	2037	2709-2727	AGUGAAUGUCACCAAGUGAdTdT	2604
AD-61882.1	CAUUCACUGUGCUUCCUCUdTdT	2038	2720-2738	AGAGGAAGCACAGUGAAUGdTdT	2605
AD-61888.1	GGAAAUUGCCUUCACAACdTdT	2039	2739-2757	GUUGUGAAGGCCAAUUUCCdTdT	2606
AD-61894.1	CUUCACAACAUAUUUUUdTdT	2040	2749-2767	AAAAAUUGAUGUUGUGAAGdTdT	2607
AD-61900.1	AAUUUUUCACUGGAGACUUdTdT	2041	2761-2779	AAGUCUCCAGUGAAAAAUUdTdT	2608
AD-61906.1	CUGGAGACUUGGUUUGGAAAdTdT	2042	2770-2788	UUCCAAACCAAGUCUCCAGdTdT	2609

AD-61912.1	GGUUUGGAAAAGAAAUCUdTdT	2043	2780-2798	AAGAUUUUUUCCAAACcdTdT	2610
AD-61918.1	AAUCUUAGUAAAAACAUAdTdT	2044	2793-2811	UAAUGUUUUUACUAAGAUdTdT	2611
AD-61877.1	AAAAACAUUACGAGUGGUGdTdT	2045	2802-2820	CACCACUCGUA AUGUUUUdTdT	2612
AD-61883.1	GAGUGGUGCCAGAAGGUGUdTdT	2046	2813-2831	ACACCUUCUGGCACCACUCdTdT	2613
AD-61889.1	AGAAGGUGUCAAAAAGGGAAdTdT	2047	2823-2841	UUCCCUUUUGACACCUUCUdTdT	2614
AD-61895.1	UGUCAAAAAGGGAAAGCUAUdTdT	2048	2829-2847	AUAGCUUUCCCUUUUGACAdTdT	2615
AD-61901.1	GCUAUUCUGGUGUUACUUUdTdT	2049	2843-2861	AAAGUAACACCAGAAUAGCdTdT	2616
AD-61907.1	GUGUUACUUUGGAUCCUAGdTdT	2050	2852-2870	CUAGGAUCCAAAGUAACACdTdT	2617
AD-61913.1	GGAUCCUAGGGGUUUUUAdTdT	2051	2862-2880	AUAAAUACCCCUAGGAUCCdTdT	2618
AD-61919.1	GGUAAUUUAUGGUACCAUUAdTdT	2052	2872-2890	UAAUGGUACCAUAAAUACcdTdT	2619
AD-61878.1	GUACCAUUAGCAGACGAAAdTdT	2053	2882-2900	UUUCGUCUGCUAAUGGUACdTdT	2620
AD-61884.1	CAGACGAAAGGAGUUCCAdTdT	2054	2892-2910	UGGGAACUCCUUUCGUCUGdTdT	2621
AD-61890.1	AGGAGUCCCAUACAGGAUdTdT	2055	2900-2918	AUCCUGUAUGGGAACUCCUdTdT	2622
AD-61896.1	CAUACAGGAUACCCUUAGAdTdT	2056	2909-2927	UCUAAGGGUAUCCUGUAUGdTdT	2623
AD-61902.1	CUUAGAUUUGGUCCCCAAAdTdT	2057	2922-2940	UUUGGGACCAAAUCUAAGdTdT	2624
AD-61908.1	UCCCCAAAACAGAAAUCAAdTdT	2058	2933-2951	UUGAUUUUCUGUUUUGGGGAdTdT	2625
AD-61914.1	ACAGAAAUCAAAAGGAUUUdTdT	2059	2941-2959	AAAUCCUUUUGAUUUCUGUdTdT	2626
AD-61920.1	AAAGGAUUUUGAGUGUAAAAdTdT	2060	2951-2969	UUUACACUCAAAAUCCUUUdTdT	2627
AD-61879.1	AGUGUAAAAGGACUGCUUGdTdT	2061	2962-2980	CAAGCAGUCCUUUUACACUdTdT	2628
AD-61885.1	AAGGACUGCUUGUAGGUGAdTdT	2062	2969-2987	UCACCUACAAGCAGUCCUUdTdT	2629
AD-61891.1	GUAGGUGAGAUCUUGUCUGdTdT	2063	2980-2998	CAGACAAGAUCUCACCUACdTdT	2630
AD-61897.1	AUCUUGUCUGCAGUUCUAAAdTdT	2064	2989-3007	UUAGAACUGCAGACAAGAUdTdT	2631

AD-61903.1	GUUCUAAGUCAGGAAGGCAdTdT	2065	3001-3019	UGCCUUCCUGACUUAGAACdTdT	2632
AD-61909.1	GAAGGCAUCAUAUCCUAAdTdT	2066	3013-3031	UUAGGAUAUUGAUGCCUUCdTdT	2633
AD-61915.1	UCAUAUCCUAACCCACCUdTdT	2067	3020-3038	AGGUGGGUUAGGAUAUUGAdTdT	2634
AD-61921.1	CCACCUCCCAAAGGGAGUdTdT	2068	3033-3051	ACUCCCUUUGGGGAGGUGGdTdT	2635
AD-61927.1	CCCCAAAGGGAGUGCAGAGdTdT	2069	3039-3057	CUCUGCACUCCCUUUGGGGdTdT	2636
AD-61933.1	GUGCAGAGGCGGAGCUGAUdTdT	2070	3050-3068	AUCAGCUCCGCCUCUGCACdTdT	2637
AD-61939.1	GGAGCUGAUGAGCGUUGUCdTdT	2071	3060-3078	GACAACGCUCAUCAGCUCdTdT	2638
AD-61945.1	CGUUGUCCAGUAUUCUAUdTdT	2072	3072-3090	AUAGAAUACUGGGACAACGdTdT	2639
AD-61951.1	CCAGUAUUCUAUGUUUUUCdTdT	2073	3079-3097	GAAAAACAUAGAAUACUGGdTdT	2640
AD-61957.1	GUUUUUCACUACCUGGAAAdTdT	2074	3091-3109	UUUCCAGGUAGUGAAAAACdTdT	2641
AD-61963.1	CCUGGAAACAGGAAAUCAUdTdT	2075	3102-3120	AUGAUUUCUGUUUCCAGGdTdT	2642
AD-61922.1	GGAACAUUUUUCAUUCUGAdTdT	2076	3122-3140	UCAGAAUGAAAAAUGUUCdTdT	2643
AD-61928.1	CAUUCUGACCCAUAUAAUUGdTdT	2077	3133-3151	CAAUAAUUGGGUCAGAAUGdTdT	2644
AD-61934.1	CCAUUAAUUGAAAAGCAGAdTdT	2078	3142-3160	UCUGCUUUUCAAUUAAUGGdTdT	2645
AD-61940.1	AAAGCAGAAACUGAAGAAAdTdT	2079	3153-3171	UUUCUUCAGUUUCUGCUUdTdT	2646
AD-61946.1	AACUGAAGAAAAAAUUAAdTdT	2080	3161-3179	UUUAAUUUUUUCUUCAGUdTdT	2647
AD-61952.1	AAAAAAUUAAGAAGGGAdTdT	2081	3169-3187	UCCCUUCUUUAAUUUUUdTdT	2648
AD-61958.1	AGGGAUGUUGAGCAUUAUGdTdT	2082	3183-3201	CAUAAUGCACAACAUCCCUdTdT	2649
AD-61964.1	GAGCAUUAUGUCCUACAGAdTdT	2083	3192-3210	UCUGUAGGACAUAUUGCUCdTdT	2650
AD-61923.1	UGUCCUACAGAAUUGCUGAdTdT	2084	3200-3218	UCAGCAUUCUGUAGGACAdTdT	2651
AD-61929.1	AAUGCUGACUACUCUACAdTdT	2085	3211-3229	UGUAAGAGUAGUCAGCAUdTdT	2652
AD-61935.1	UACUCUACAGUGUGUGGAdTdT	2086	3220-3238	UCCACACACUGUAAGAGUAdTdT	2653

AD-61941.1	AGUGUGUGGAAGGGUGGAAAdTdT	2087	3229-3247	UUCCACCCUCCACACACUdTdT	2654
AD-61947.1	GGGUGGAAGUGCUAGCACUdTdT	2088	3240-3258	AGUGCUAGCACUCCACCCdTdT	2655
AD-61953.1	GCUAGCACUUGGUUAAACAGdTdT	2089	3250-3268	CUGUUAACCAAGUGCUAGCdTdT	2656
AD-61959.1	GGUUAACAGCUUUUGCUUUdTdT	2090	3260-3278	AAAGCAAAGCUGUUAACcdTdT	2657
AD-61965.1	UGC UUAAGAGUACUUGGAdTdT	2091	3273-3291	UCCAAGUACUCUUAAGCAdTdT	2658
AD-61924.1	GUACUUGGACAAGUAAAAdTdT	2092	3283-3301	UAUUUACUUGUCCAAGUACdTdT	2659
AD-61930.1	CAAGUAAAUAAAACGUAGdTdT	2093	3292-3310	CUACGUUUUUUUACUUGdTdT	2660
AD-61936.1	AUAAAUACGUAGAGCAGAAAdTdT	2094	3299-3317	UUCUGCUCUACGUUUUUAdTdT	2661
AD-61942.1	GAGCAGAACC AAAUUCAdTdT	2095	3310-3328	UUGAAUUUUGGUUCUGCUCdTdT	2662
AD-61948.1	AAUUC AAUUGUAAUUCUdTdT	2096	3322-3340	AAGAAUUACAAUUGAAUdTdT	2663
AD-61954.1	GUAAUUCUUUAUUGUGGCdTdT	2097	3332-3350	AGCCACAAUAAAGAAUUCdTdT	2664
AD-61960.1	AUUGUGGCUAGUUGAGAAUdTdT	2098	3342-3360	AUUCUCAACUAGCCACAAUdTdT	2665
AD-61966.1	CUAGUUGAGAAUUAUCAAUdTdT	2099	3349-3367	AUUGAUAAUUCUCAACUAGdTdT	2666
AD-61925.1	UUAUCAAUUAGAUAAUGGAdTdT	2100	3360-3378	UCCAUUUUCUAAUUGAUAAAdTdT	2667
AD-61931.1	AAUGGAUCUUUCAAGGAAAAdTdT	2101	3373-3391	UUUCCUUGAAAGAUCCAUdTdT	2668
AD-61937.1	CUUUCAAGGAAA AUUCACAdTdT	2102	3380-3398	UGUGAAUUUCCUUGAAAGdTdT	2669
AD-61943.1	AAUUCACAGUAUCAACCAAdTdT	2103	3391-3409	UUGGUUGAUACUGUGAAUdTdT	2670
AD-61949.1	GUAUCAACCAUAAA AUAdTdT	2104	3399-3417	UAAUUUU AUUGGUUGAUACdTdT	2671
AD-61955.1	AAAAUUACAGGGUACCUUGdTdT	2105	3411-3429	CAAGGUACCCUGUAAUUUUdTdT	2672
AD-61961.1	AGGGUACCUUGCCUGUUGAdTdT	2106	3419-3437	UCAACAGGCAAGGUACCCUdTdT	2673
AD-61967.1	GUUGAAGCCCGAGAGAACAdTdT	2107	3433-3451	UGUUCUCUCGGGCUUCAACdTdT	2674
AD-61926.1	CCGAGAGAACAGCUUAUAUdTdT	2108	3441-3459	AUAUAAGCUGUUCUCUCGGdTdT	2675

AD-61932.1	GCUUAUAUCUUACAGCCUdTdT	2109	3452-3470	AAGGCUGUAAGAUUAAGCdTdT	2676
AD-61938.1	CUUACAGCCUUUACUGUGAdTdT	2110	3460-3478	UCACAGUAAAGGCUGUAAGdTdT	2677
AD-61944.1	GAAUUAGAAAGGCUUUCGAdTdT	2111	3482-3500	UCGAAAGCCUUUCUAAUUCdTdT	2678
AD-61950.1	GGCUUUCGAUUAUUGCCCCdTdT	2112	3492-3510	GGGGCAUUAUCGAAAGCCdTdT	2679
AD-61956.1	GAUUAUUGCCCCUGGUGAdTdT	2113	3499-3517	UCACCAGGGGGCAUUAUUCdTdT	2680
AD-61962.1	GGUGAAAAUCGACACAGCUdTdT	2114	3513-3531	AGCUGUGUCGAUUUUCACCDdTdT	2681
AD-61968.1	CGACACAGCUCUAAUUAAdTdT	2115	3522-3540	UUUAAUUAGAGCUGUGUCGdTdT	2682
AD-61974.1	GCUCUAAUUAAGCUGACAdTdT	2116	3529-3547	UGUCAGCUUUAUUAGAGCdTdT	2683
AD-61980.1	CUGACAACUUUCUGCUUGAdTdT	2117	3542-3560	UCAAGCAGAAAGUUGUCAGdTdT	2684
AD-61986.1	CUUUCUGCUUGAAAAUACAdTdT	2118	3549-3567	UGUAUUUCAAGCAGAAAGdTdT	2685
AD-61992.1	AAAAUACACUGCCAGCCAdTdT	2119	3560-3578	UGGGCUGGCAGUGUAUUUdTdT	2686
AD-61998.1	AGCCCAGAGCACCUUUACAdTdT	2120	3573-3591	UGUAAAGGUGCUCUGGGCUdTdT	2687
AD-62004.1	GCACCUUACAUUGGCCAUdTdT	2121	3581-3599	AUGGCCAAUGUAAAGGUGCdTdT	2688
AD-62010.1	ACAUUGGCCAUUUCUGCGUdTdT	2122	3589-3607	ACGCAGAAUUGGCCAAUGUdTdT	2689
AD-61969.1	CUGCGUAUGCUCUUUCCCUdTdT	2123	3602-3620	AGGGAAAGAGCAUACGCAGdTdT	2690
AD-61975.1	CUUUCCCUGGGAGAUAAAAdTdT	2124	3613-3631	UUUUAUCUCCCAGGGAAAGdTdT	2691
AD-61981.1	GAGAUAAAACUCACCCACAdTdT	2125	3623-3641	UGUGGGUGAGUUUUAUCUCdTdT	2692
AD-61987.1	ACUCACCCACAGUUUCGUUdTdT	2126	3631-3649	AACGAAACUGUGGGUGAGUdTdT	2693
AD-61993.1	CAGUUUCGUUCAAUUGUUUdTdT	2127	3640-3658	AAACAAUUGAACGAAACUGdTdT	2694
AD-61999.1	CAAUUGUUUCAGCUUUGAAAdTdT	2128	3650-3668	UUCAAAGCUGAAACAAUUGdTdT	2695
AD-62005.1	CUUUGAAGAGAGAAGCUUdTdT	2129	3662-3680	AAAGCUUCUCUCUCAAAGdTdT	2696
AD-62011.1	GAGAGAAGCUUUGGUUAAAAdTdT	2130	3669-3687	UUUAACCAAAGCUUCUCUCdTdT	2697

AD-61970.1	GUUAAAGGUAAUCCACCCAdTdT	2131	3682-3700	UGGGUGGAUUACCUUUAAACdTdT	2698
AD-61976.1	AAUCCACCCAUUUUAUCGUUdTdT	2132	3691-3709	AACGAUAAAUGGGUGGAUdTdT	2699
AD-61982.1	CAUUUAUCGUUUUUGGAAAdTdT	2133	3699-3717	UUUCCAAAAACGAUAAAUGdTdT	2700
AD-61988.1	UUUGGAAAGACAAUCUUCAdTdT	2134	3710-3728	UGAAGAUUGUCUUUCCAAAdTdT	2701
AD-61994.1	AAUCUUCAGCAUAAAGACAdTdT	2135	3721-3739	UGUCUUUAUGCUGAAGAUdTdT	2702
AD-62006.1	CUCUGUACCUAACACUGGUdTdT	2136	3741-3759	ACCAGUGUUAGGUACAGAGdTdT	2703
AD-62012.1	ACACUGGUACGGCACGUAdTdT	2137	3752-3770	AUACGUGCCGUACCAGUGUdTdT	2704
AD-61971.1	GGCACGUAUGGUAGAAACAdTdT	2138	3762-3780	UGUUUCUACCAUACGUGCCdTdT	2705
AD-61977.1	GGUAGAAACAACUGCCUAUdTdT	2139	3771-3789	AUAGGCAGUUGUUUCUACCdTdT	2706
AD-61983.1	CAACUGCCUAUGCUUUACUdTdT	2140	3779-3797	AGUAAAGCAUAGGCAGUUGdTdT	2707
AD-61989.1	CUUUACUCACCAGUCUGAAAdTdT	2141	3791-3809	UUCAGACUGGUGAGUAAAGdTdT	2708
AD-61995.1	GUCUGAACUUGAAAGAUAdTdT	2142	3803-3821	AUAUCUUUCAAGUUCAGACdTdT	2709
AD-62001.1	ACUUGAAAGAUUAAAUUAdTdT	2143	3809-3827	UAAUUUAUAUCUUUCAAGUdTdT	2710
AD-62007.1	UAUAAAUAUGUUAACCCAdTdT	2144	3819-3837	UGGGUUAACAUAUUUAUAdTdT	2711
AD-62013.1	GUUAACCCAGUCAUCAAAUdTdT	2145	3829-3847	AUUUGAUGACUGGGUUAACdTdT	2712
AD-61972.1	UCAUCAAAUGGCUAUCAGAdTdT	2146	3839-3857	UCUGAUAGCCAUUUGAUGAdTdT	2713
AD-61978.1	UAUCAGAAGAGCAGAGGUAdTdT	2147	3851-3869	UACCUCUGCUCUUCUGAUAdTdT	2714
AD-61984.1	AGAGGUAUGGAGGUGGCUUdTdT	2148	3863-3881	AAGCCACCUCCAUAACCUCUdTdT	2715
AD-61990.1	GAGGUGGCUUUUAUUCAACdTdT	2149	3872-3890	GUUGAAUAAAAGCCACCUCdTdT	2716
AD-61996.1	UAUUCAACCCAGGACACAAAdTdT	2150	3883-3901	UUGUGUCCUGGGUUGAAUAdTdT	2717
AD-62002.1	AGGACACAAUCAAUGCCAUdTdT	2151	3893-3911	AUGGCAUUGAUUGUGUCCUdTdT	2718
AD-62008.1	CAAUCAAUGCCAUUGAGGGdTdT	2152	3899-3917	CCCUCAAUHGCAUUGAUUGdTdT	2719

AD-62014.1	CAUUGAGGGCCUGACGGAAAdTdT	2153	3909-3927	UUCCGUCAGGCCCUCAAUGdTdT	2720
AD-61973.1	ACGGAAUAUUCACUCCUGGdTdT	2154	3922-3940	CCAGGAGUGAAUAUCCGUdTdT	2721
AD-61979.1	UUCACUCCUGGUUAAACAAdTdT	2155	3930-3948	UUGUUUAACCAGGAGUGAAAdTdT	2722
AD-61985.1	GGUUAACAACUCCGCUUGdTdT	2156	3939-3957	CAAGCGGAGUUGUUUAACcdTdT	2723
AD-61991.1	CCGCUUGAGUAUGGACAUCdTdT	2157	3951-3969	GAUGUCCAUAUCUAAGCGGdTdT	2724
AD-61997.1	GGACAUCGAUGUUUCUUCAdTdT	2158	3963-3981	GUAAGAAACAUCGAUGUCCdTdT	2725
AD-62003.1	CGAUGUUUCUUACAAGCAUdTdT	2159	3969-3987	AUGCUUGUAAGAAACAUCGdTdT	2726
AD-62009.1	CAAGCAUAAAGGUGCCUAdTdT	2160	3981-3999	UAAGGCACCUUUUAUGCUUGdTdT	2727
AD-62056.1	GUGCCUUACAUAUUUAUAAdTdT	2161	3992-4010	UUUAUUUAUGUAAGGCACdTdT	2728
AD-62015.1	ACAUAAUUUAUAAAUGACAdTdT	2162	3999-4017	UGUCAUUUUUAUUUAUGUdTdT	2729
AD-62021.1	AAAUGACAGACAAGAAUdTdT	2163	4009-4027	AAUUCUUGUCUGUCAUUUdTdT	2730
AD-62027.1	CAAGAAUUCCUUGGGAGGdTdT	2164	4020-4038	CCUCCCAAGGAAUUCUUGdTdT	2731
AD-62033.1	CCUUGGGAGGCCAGUAGAGdTdT	2165	4029-4047	CUCUACUGGCCUCCCAAGGdTdT	2732
AD-62039.1	AGUAGAGGUGCUUCUCAAdTdT	2166	4041-4059	AUUGAGAAGCACCUCUACUdTdT	2733
AD-62045.1	CUUCUCAAUUGAUGACCUCAdTdT	2167	4051-4069	UGAGGUCAUCAUUGAGAAGdTdT	2734
AD-62051.1	UGACCUCAUUGUCAGUACAdTdT	2168	4062-4080	UGUACUGACAAUGAGGUCAdTdT	2735
AD-62057.1	GUCAGUACAGGAUUUGGCAdTdT	2169	4072-4090	UGCCAAAUCCUGUACUGACdTdT	2736
AD-62016.1	AGGAUUUGGCAGUGGCUUGdTdT	2170	4080-4098	CAAGCCACUGCCAAAUCCUdTdT	2737
AD-62022.1	UGGCUUGGCUACAGUACAAdTdT	2171	4092-4110	AUGUACUGUAGCCAAGCCAdTdT	2738
AD-62028.1	GCUACAGUACAUGUAACAAdTdT	2172	4099-4117	UUGUUACAUGUACUGUAGCdTdT	2739
AD-62034.1	AACAACUGUAGUUCACAAAdTdT	2173	4113-4131	UUUGUGAACUACAGUUGUdTdT	2740
AD-62040.1	GUAGUUCACAAAACCAGUAdTdT	2174	4120-4138	UACUGGUUUUGUGAACUACdTdT	2741

AD-62046.1	AAACCAGUACCUCUGAGGAdTdT	2175	4130-4148	UCCUCAGAGGUACUGGUUUdTdT	2742
AD-62052.1	UGAGGAAGUUUGCAGCUUUdTdT	2176	4143-4161	AAAGCUGCAAACUCCUCAdTdT	2743
AD-62058.1	UGCAGCUUUUAUUUGAAAAdTdT	2177	4153-4171	UUUUCAAAUAAAAGCUGCAdTdT	2744
AD-62017.1	AUUUGAAAUCGAUACUCAdTdT	2178	4163-4181	UGAGUAUCGAUUUCAAUdTdT	2745
AD-62023.1	CGAUACUCAGGAUUAUGAAAdTdT	2179	4173-4191	UUCAAUAUCCUGAGUAUCGdTdT	2746
AD-62029.1	GGAUUAUGAAGCAUCCCACdTdT	2180	4182-4200	GUGGGAUGCUUCAUAUCCdTdT	2747
AD-62035.1	GAAGCAUCCCACUACAGAGdTdT	2181	4189-4207	CUCUGUAGUGGGAUGCUUCdTdT	2748
AD-62041.1	ACUACAGAGGCUACGGAAAAdTdT	2182	4199-4217	UUUCCGUAGCCUCUGUAGUdTdT	2749
AD-62047.1	CGGAAACUCUGAUUACAAAAdTdT	2183	4212-4230	UUUGUAAUCAGAGUUUCCGdTdT	2750
AD-62053.1	UGAUUACAAACGCAUAGUAdTdT	2184	4221-4239	UACUAUGCGUUUGUAAUCAdTdT	2751
AD-62059.1	GCAUAGUAGCAUGUGCCAGdTdT	2185	4232-4250	CUGGCACAUGCUACUAUGCdTdT	2752
AD-62018.1	GCAUGUGCCAGCUACAAGCdTdT	2186	4240-4258	GCUUGUAGCUGGCACAUGCdTdT	2753
AD-62024.1	CUACAAGCCCAGCAGGGAAAdTdT	2187	4251-4269	UUCCCUGCUGGGCUUGUAGdTdT	2754
AD-62030.1	CAGCAGGGAAGAAUCAUCAdTdT	2188	4260-4278	UGAUGAUUCUCCUGCUGdTdT	2755
AD-62036.1	GAAUCAUCAUCUGGAUCCUdTdT	2189	4270-4288	AGGAUCCAGAUGAUGAUUCdTdT	2756
AD-62042.1	GAUCCUCUCAUGCGGUGAUdTdT	2190	4283-4301	AUCACCGCAUGAGAGGAUCdTdT	2757
AD-62048.1	CUCAUGCGGUGAUGGACAUdTdT	2191	4289-4307	AUGUCCAUCACCGCAUGAGdTdT	2758
AD-62054.1	GAUGGACAUCUCCUUGCCUdTdT	2192	4299-4317	AGGCAAGGAGAUGUCCAUCdTdT	2759
AD-62060.1	CUUGCCUACUGGAAUCAGUdTdT	2193	4311-4329	ACUGAUUCCAGUAGGCAAGdTdT	2760
AD-62019.1	GAAUCAGUGCAAUGAAGAdTdT	2194	4322-4340	UCUUCAUUUGCACUGAUUCdTdT	2761
AD-62025.1	AAAUGAAGAAGACUUAAAAdTdT	2195	4332-4350	UUUUAAGUCUUCUUCAUUdTdT	2762
AD-62031.1	GAAGACUUAAAAGCCCUUGdTdT	2196	4339-4357	CAAGGGCUUUUAAGUCUUCdTdT	2763



AD-62037.1	CCUUGUGGAAGGGGUGGAUdTdT	2197	4353-4371	AUCCACCCCUUCCACAAGGdTdT	2764
AD-62043.1	GAAGGGGUGGAUCAACUAUdTdT	2198	4360-4378	AUAGUUGAUCCACCCCUUCdTdT	2765
AD-62049.1	AUCAACUAUUCACUGAUUAdTdT	2199	4370-4388	UAAUCAGUGAAUAGUUGAUdTdT	2766
AD-62055.1	CACUGAUUACCAAUCAAAdTdT	2200	4380-4398	UUUGAUUUGGUAUUCAGUGdTdT	2767
AD-62061.1	AUCAAGAUGGACAUGUUAdTdT	2201	4393-4411	UAACAUGUCCAUCUUUGAUdTdT	2768
AD-62020.1	GGACAUGUUAUUCUGCAACdTdT	2202	4402-4420	GUUGCAGAAUAACAUGUCCdTdT	2769
AD-62026.1	UCUGCAACUGAAUUCGAUdTdT	2203	4413-4431	AAUCGAAUUCAGUUGCAGAdTdT	2770
AD-62032.1	GAAUUCGAUUCUCCUCCAGUdTdT	2204	4422-4440	ACUGGAGGGAAUCGAAUUCdTdT	2771
AD-62038.1	CCCUCCAGUGAUUCCUUdTdT	2205	4432-4450	AAAGGAAAUCACUGGAGGGdTdT	2772
AD-62044.1	GAUUUCCUUUGUGUACGAUdTdT	2206	4441-4459	AUCGUACACAAAGGAAAUCdTdT	2773
AD-62050.1	GUACGAUUCGGGAUAAUUGdTdT	2207	4453-4471	CAAUAUCCGGAAUCGUACdTdT	2774
AD-62320.1	CGGAUAAUUGAACUCUUUGdTdT	2208	4462-4480	CAAAGAGUUCAAAUAUCCGdTdT	2775
AD-62326.1	ACUCUUUGAAGUUGGGUUdTdT	2209	4473-4491	AAACCCAACUUCAAAGAGUdTdT	2776
AD-62332.1	AGUUGGGUUUCUCAGUCCUdTdT	2210	4482-4500	AGGACUGAGAAACCCAACUdTdT	2777
AD-62338.1	UUCUCAGUCCUGCCACUUdTdT	2211	4490-4508	AAAGUGGCAGGACUGAGAAAdTdT	2778
AD-62344.1	CACUUUCACAGUGUACGAAAdTdT	2212	4503-4521	UUCGUACACUGUGAAAGUGdTdT	2779
AD-62350.1	CACAGUGUACGAAUACCACdTdT	2213	4509-4527	GUGGUAAUUCGUACACUGUGdTdT	2780
AD-62356.1	ACCACAGACCAGAUAAACAdTdT	2214	4523-4541	UGUUUAUCUGGUCUGUGGUdTdT	2781
AD-62362.1	CCAGAUAAACAGUGUACCAAdTdT	2215	4531-4549	UGGUACACUGUUUAUCUGGdTdT	2782
AD-62321.1	CAGUGUACCAUGUUUUAUAdTdT	2216	4540-4558	UAUAAAACAUGGUACACUGdTdT	2783
AD-62327.1	GUUUUAUAGCACUCCAAUdTdT	2217	4551-4569	AUUGGAAGUGCUAUAAAACdTdT	2784
AD-62333.1	CUUCCAAUAUCAAAAUUCAdTdT	2218	4562-4580	UGAAUUUUGAUUAUUGGAAGdTdT	2785

AD-62339.1	AUCAAAAUUCAGAAAGUCUdTdT	2219	4570-4588	AGACUUUCUGAAUUUUGAUdTdT	2786
AD-62345.1	GAAAGUCUGUGAAGGAGCCdTdT	2220	4581-4599	GGCUCCUUCACAGACUUUCdTdT	2787
AD-62351.1	GAAGGAGCCGCGUGCAAGUdTdT	2221	4591-4609	ACUUGCACGCGGCUCCUUCdTdT	2788
AD-62357.1	CGUGCAAGUGUGUAGAAGCdTdT	2222	4601-4619	GCUUCUACACACUUGCACGdTdT	2789
AD-62363.1	GUAGAAGCUGAUUGUGGGCdTdT	2223	4612-4630	GCCCACAAUCAGCUUCUACdTdT	2790
AD-62322.1	CUGAUUGUGGGCAAUGCdTdT	2224	4619-4637	UGCAUUUGCCCACAAUCAGdTdT	2791
AD-62328.1	GCAAUUGCAGGAAGAAUUGdTdT	2225	4629-4647	CAAUUCUCCUGCAUUUGCdTdT	2792
AD-62334.1	GAAGAAUUGGAUCUGACAAdTdT	2226	4639-4657	UUGUCAGAUCCAAUUCUUCdTdT	2793
AD-62340.1	CUGACAAUCUCUGCAGAGAdTdT	2227	4651-4669	UCUCUGCAGAGAUUGUCAGdTdT	2794
AD-62346.1	GCAGAGACAAGAAAACAAAdTdT	2228	4663-4681	UUUGUUUUCUUGUCUCUGCdTdT	2795
AD-62352.1	CAAGAAAACAAACAGCAUGdTdT	2229	4670-4688	CAUGCUGUUUGUUUUCUUGdTdT	2796
AD-62358.1	ACAGCAUGUAAACCAGAGAdTdT	2230	4681-4699	UCUCUGGUUUACAUGCUGUdTdT	2797
AD-62364.1	CCAGAGAUUGCAUAUGC UUdTdT	2231	4693-4711	AAGCAUAUGCAAUCUCUGGdTdT	2798
AD-62323.1	GCAUAUGC UUAAUAAAGUUAdTdT	2232	4702-4720	UAACUUUAUAAGCAUAUGCdTdT	2799
AD-62329.1	UUUAUAAAGUUAGCAUCACAdTdT	2233	4710-4728	UGUGAUGC UAACUUUAUAAdTdT	2800
AD-62335.1	CAUCACAUC CAUCACUGUAdTdT	2234	4722-4740	UACAGUGAUGGAUGUGAUGdTdT	2801
AD-62341.1	UCACUGUAGAAA AUGUUUdTdT	2235	4733-4751	AAAACA UUUUCUACAGUGAdTdT	2802
AD-62347.1	AGAAA AUGUUUUGUCAAGdTdT	2236	4740-4758	CUUGACAAAACA UUUUCUdTdT	2803
AD-62353.1	UUUGUCAAGUACAAGGCAAdTdT	2237	4750-4768	UUGCCUUGUACUUGACAAAdTdT	2804
AD-62359.1	AGGCAACCCUUCUGGAUAdTdT	2238	4763-4781	AUAUCCAGAAGGGUUGCCUdTdT	2805
AD-62365.1	CCUUCUGGAUAUCUACAAAdTdT	2239	4770-4788	UUUGUAGAUAUCCAGAAGGdTdT	2806
AD-62324.1	UAUCUACAAAACUGGGGAAdTdT	2240	4779-4797	UUCCCCAGUUUUGUAGAUAdTdT	2807

AD-62330.1	CUGGGGAAGCUGUUGCUGAdTdT	2241	4790-4808	UCAGCAACAGCUUCCCCAGdTdT	2808
AD-62336.1	CUGUUGCUGAGAAAGACUCdTdT	2242	4799-4817	GAGUCUUUCUCAGCAACAGdTdT	2809
AD-62342.1	GACUCUGAGAUUACCUUCAdTdT	2243	4813-4831	UGAAGGUAUUCUCAGAGUCdTdT	2810
AD-62348.1	GAGAUUACCUUCAUUAAAAdTdT	2244	4819-4837	UUUUAUGAAGGUAAUCUCdTdT	2811
AD-62354.1	AUUAAAAAGGUAACCUGUAdTdT	2245	4831-4849	UACAGGUUACCUUUUAAUdTdT	2812
AD-62360.1	UAACCUGUACUAACGCUGAdTdT	2246	4841-4859	UCAGCGUUGUACAGGUUAdTdT	2813
AD-62366.1	CUAACGCUGAGCUGGUAAAAdTdT	2247	4850-4868	UUUACCAGCUCAGCGUUAGdTdT	2814
AD-62325.1	GGUAAAAGGAAGACAGUACdTdT	2248	4863-4881	GUACUGUCUCCUUUUACCdTdT	2815
AD-62331.1	GAAGACAGUACUUAUUUAUdTdT	2249	4871-4889	AUAAUUAAAGUACUGUCUUCdTdT	2816
AD-62337.1	CUUAAUUUAUGGGUAAAGAAAdTdT	2250	4881-4899	UUCUUUACCCAUAAUUAAAGdTdT	2817
AD-62343.1	UAAAGAAGCCCUCCAGAUAdTdT	2251	4893-4911	UAUCUGGAGGGCUUCUUUAdTdT	2818
AD-62349.1	CCUCCAGAUAAAAUACAAUdTdT	2252	4902-4920	AUUGUAUUUUUUCUGGAGGdTdT	2819
AD-62355.1	AAAUACAAUUUCAGUUUCAdTdT	2253	4912-4930	UGAAACUGAAAUUGUAUUUdTdT	2820
AD-62361.1	CAGUUUCAGGUACAUCUACdTdT	2254	4923-4941	GUAGAUGUACCUGAAACUGdTdT	2821
AD-62367.1	GGUACAUCUACCCUUUAGAdTdT	2255	4931-4949	UCUAAAGGGUAGAUGUACCdTdT	2822
AD-62373.1	CCUUUAGAUUCCUUGACCUdTdT	2256	4942-4960	AGGUCAAGGAAUCUAAAGGdTdT	2823
AD-62379.1	CCUUGACCUGGAUUGAAUAdTdT	2257	4952-4970	UAUUCAAUCCAGGUCAAGGdTdT	2824
AD-62385.1	GGAUUGAAUACUGGCCUAGdTdT	2258	4961-4979	CUAGGCCAGUAUUCAAUCCdTdT	2825
AD-62391.1	CUGGCCUAGAGACACAACAdTdT	2259	4971-4989	UGUUGUGUCUCUAGGCCAGdTdT	2826
AD-62397.1	GAGACACAACAUGUUCAUCdTdT	2260	4979-4997	GAUGACAUGUUGUGUCUCdTdT	2827
AD-62403.1	GUUCAUCGUGUCAAGCAUUdTdT	2261	4991-5009	AAUGCUUGACACGAUGAACdTdT	2828
AD-62409.1	GUCAAGCAUUUUUAGCUAAAdTdT	2262	5000-5018	UUAGCUAAAAAUGCUUGACdTdT	2829

AD-62368.1	AGCUAAUUUAGAUGAAUUUdTdT	2263	5013-5031	AAAUUCAUCUAAAUUAGCUdTdT	2830
AD-62374.1	AGAUGAAUUUGCCGAAGAUdTdT	2264	5022-5040	AUCUUCGGCAAUUUCAUCUdTdT	2831
AD-62380.1	CCGAAGAUUUCUUUUAAAAdTdT	2265	5033-5051	UUUAAAAAGAUUUCUUCGGdTdT	2832
AD-62386.1	CUUUUUAAAUGGAUGCUAAdTdT	2266	5043-5061	UUAGCAUCCAUUUAAAAGdTdT	2833
AD-62392.1	GGAUGC UAAA UUCUGAAAdTdT	2267	5053-5071	UUCAGGAAUUUUAGCAUCCdTdT	2834
AD-62398.1	UAAA AUCCUGAAGUUCAGdTdT	2268	5059-5077	CUGAACUUCAGGAAUUUUAdTdT	2835
AD-62404.1	AGUUCAGCUGCAUACAGUdTdT	2269	5071-5089	AACUGUAUGCAGCUGAACUdTdT	2836
AD-62410.1	GCAUACAGUUUGCACUUAUdTdT	2270	5080-5098	AUAAGUGCAAACUGUAUGCdTdT	2837
AD-62369.1	ACUUAUGGACUCCUGUUGUdTdT	2271	5093-5111	ACAACAGGAGUCCAUAAGUdTdT	2838
AD-62375.1	GGACUCCUGUUGUUGAAGUdTdT	2272	5099-5117	ACUUCAACAACAGGAGUCCdTdT	2839
AD-62381.1	UGUUGAAGUUCGUUUUUUdTdT	2273	5109-5127	AAAAAACGAACUUCAACAdTdT	2840
AD-62387.1	UUUUUGUUUCUUCUUUdTdT	2274	5122-5140	AAAAGAAGAAAACAAAAAdTdT	2841
AD-62393.1	UCUUCUUUUUUAAACA UdTdT	2275	5132-5150	AAUGUUUAAAAAAGAAGdTdT	2842
AD-62399.1	UUUUUAAACA UUCAUAGCUdTdT	2276	5139-5157	AGCUAUGAAUGUUUAAAAdTdT	2843
AD-62405.1	AUAGCUGGUCUUAUUUGUAdTdT	2277	5152-5170	UACAAAUAGACCAGCUAUdTdT	2844
AD-62411.1	GUCUUAUUUGUAAAGCUCAdTdT	2278	5159-5177	UGAGCUUACAAAUAAGACdTdT	2845
AD-62370.1	AAAGCUCACUUUACUUAGAdTdT	2279	5170-5188	UCUAAGUAAAGUGAGCUUdTdT	2846
AD-62376.1	ACUUGAAUUAGUGGCACUdTdT	2280	5182-5200	AGUGCCACUAAUUCUAAGUdTdT	2847
AD-62382.1	AGUGGCACUUGC UUUUAUdTdT	2281	5192-5210	AAUAAAAGCAAGUGCCACUdTdT	2848
AD-62388.1	GCUUUUAUUGAGAAUGAUdTdT	2282	5202-5220	AUCAUUCUCUAAUAAAAGCdTdT	2849
AD-62394.1	GAGAAUGAUUUCAAAUGC UdTdT	2283	5212-5230	AGCAUUUGAAAUCAUUCUCdTdT	2850
AD-62400.1	UUUCAAAUGCUGUAACUUdTdT	2284	5220-5238	AAAGUUACAGCAUUUGAAAAdTdT	2851

AD-62406.1	GUAACUUUCUGAAAUAACAdTdT	2285	5231-5249	UGUUUUUCAGAAAGUUACdTdT	2852
AD-62412.1	GAAAUACAUGGCCUUGGAdTdT	2286	5241-5259	UCCAAGGCCAUGUUUUUCdTdT	2853
AD-62371.1	CCUUGGAGGGCAUGAAGACdTdT	2287	5253-5271	GUCUUCAUGCCCUCCAAGGdTdT	2854
AD-62377.1	AGGGCAUGAAGACAGAUACdTdT	2288	5259-5277	GUAUCUGUCUUCAUGCCCUdTdT	2855
AD-62383.1	GAUACUCCUCCAAGGUUAUdTdT	2289	5273-5291	AUAACCUUGGAGGAGUAUCdTdT	2856
AD-62389.1	CCUCCAAGGUUAUUGGACAdTdT	2290	5279-5297	UGUCCAAUAACCUUGGAGGdTdT	2857
AD-62395.1	GGACACCGGAAACAUAAdTdT	2291	5293-5311	UUUAUUGUUUCCGGUGUCCdTdT	2858
AD-62401.1	GAAACAAUAAAUUGGAACAdTdT	2292	5301-5319	UGUCCAAUUUAUUGUUUCdTdT	2859
AD-62407.1	AUUGGAACACCUCUCAAdTdT	2293	5311-5329	UUUGAGGAGGUGUCCAAUdTdT	2860
AD-62413.1	UCCUCAAACCUACCACUCAdTdT	2294	5322-5340	UGAGUGGUAGGUUUGAGGAdTdT	2861
AD-62372.1	CUACCACUCAGGAAUGUUUdTdT	2295	5331-5349	AAACAUUCCUGAGUGGUAGdTdT	2862
AD-62378.1	AAUGUUUGCUGGGGCCGAAdTdT	2296	5343-5361	UUCGGCCCCAGCAAACAUUdTdT	2863
AD-62384.1	UGCUGGGGCCGAAAGAACAdTdT	2297	5349-5367	UGUUCUUUCGGCCCCAGCAdTdT	2864
AD-62390.1	AAAGAACAGUCCAUUGAAAdTdT	2298	5360-5378	UUUCAUUGGACUGUUCUUUdTdT	2865
AD-62396.1	CAUUGAAAGGGAGUAUUACdTdT	2299	5371-5389	GUAUUACUCCCUUCAUGdTdT	2866
AD-62402.1	GGAGUAUUACAAAACAUGdTdT	2300	5380-5398	CAUGUUUUUGUAAUACUCCdTdT	2867
AD-62408.1	AAAACAUGGCCUUGCUUGdTdT	2301	5391-5409	CAAGCAAAGGCCAUGUUUUdTdT	2868
AD-62414.1	GCCUUUGCUUGAAAGAAAAdTdT	2302	5399-5417	UUUUCUUUCAAGCAAAGGCdTdT	2869
AD-62415.1	GAAAGAAAUAACCAAGGAAdTdT	2303	5409-5427	UUCCUUGGUUUUUUCUUUCdTdT	2870
AD-62416.1	CCAAGGAACAGGAAACUGAdTdT	2304	5420-5438	UCAGUUUCCUGUCCUUGGdTdT	2871
AD-62417.1	AACUGAUCAUUAAAGCCUGdTdT	2305	5433-5451	CAGGCUUUAUGAUCAGUUdTdT	2872

Тест разовой дозы С5 (10мМ) в клетках Нер3В с dТ-модифицированными иРНК

ID дуплекса	Avg. % оставшегося количества транскрипта
AD-61779.2	43,2
AD-61785.2	22,5
AD-61791.2	27,3
AD-61797.2	30,5
AD-61803.2	30,9
AD-61809.2	75,1
AD-61815.2	90,7
AD-61821.2	33,7
AD-61780.2	53,5
AD-61786.2	34,4
AD-61792.2	27,5
AD-61798.2	23,3
AD-61804.2	23,6
AD-61810.2	33,4
AD-61816.2	39,7
AD-61822.2	24,9
AD-61781.2	31,2
AD-61787.2	22,8
AD-61793.2	28,4
AD-61799.2	91
AD-61805.2	22,1
AD-61811.2	90,9
AD-61817.2	26,1
AD-61823.2	41,3
AD-61782.2	42,5
AD-61788.2	28,9
AD-61794.2	133,5

AD-61800.2	27,9
AD-61806.2	42,8
AD-61812.2	26,9
AD-61818.2	30,6
AD-61824.2	29,3
AD-61783.2	61,3
AD-61789.2	25,5
AD-61795.2	34,2
AD-61801.2	24,2
AD-61807.2	42,8
AD-61813.2	31
AD-61819.2	42,2
AD-61825.2	31
AD-61784.2	34,1
AD-61790.2	26,8
AD-61796.2	34,6
AD-61802.2	30
AD-61808.2	23,5
AD-61814.2	45,3
AD-61820.2	56
AD-61826.2	31,6
AD-61832.2	36,2
AD-61838.2	39,7
AD-61844.2	37
AD-61850.2	66,3
AD-61856.2	172,6
AD-61862.2	41,3
AD-61868.2	32,2
AD-61827.2	52,7
AD-61833.2	29,6
AD-61839.2	41,5
AD-61845.2	29,7

AD-61851.2	37
AD-61857.2	34,9
AD-61863.2	33,3
AD-61869.2	38,2
AD-61828.2	30,3
AD-61834.2	27,1
AD-61840.2	64,3
AD-61846.2	42
AD-61852.2	25,2
AD-61858.2	96,7
AD-61864.2	29,6
AD-61870.2	30,5
AD-61829.2	92,7
AD-61835.2	24,8
AD-61841.2	59,2
AD-61847.2	30,9
AD-61853.2	35,2
AD-61859.2	40,1
AD-61865.2	42,3
AD-61871.2	55,8
AD-61830.2	162,9
AD-61836.2	28,8
AD-61842.2	18,2
AD-61848.2	25
AD-61854.2	42,3
AD-61860.2	41,7
AD-61866.2	28,9
AD-61872.2	64,7
AD-61831.2	16,9
AD-61837.2	24,9
AD-61843.2	27,5
AD-61849.2	25,8



AD-61855.2	20
AD-61861.2	28,6
AD-61867.2	18
AD-62062.1	22
AD-62068.1	29,9
AD-62074.1	40,2
AD-62080.1	30,4
AD-62086.1	21
AD-62092.1	20
AD-62098.1	38,4
AD-62104.1	42,7
AD-62063.1	26,6
AD-62069.1	55,6
AD-62075.1	114,4
AD-62081.1	21,2
AD-62087.1	33,8
AD-62093.1	26,3
AD-62099.1	23,9
AD-62105.1	30,1
AD-62064.1	32
AD-62070.1	135,7
AD-62076.1	84,3
AD-62082.1	42,3
AD-62088.1	36,5
AD-62094.1	66
AD-62100.1	66,4
AD-62106.1	33,9
AD-62065.1	33
AD-62071.1	38,4
AD-62077.1	27,8
AD-62083.1	44,7
AD-62089.1	42,7

AD-62095.1	46,6
AD-62101.1	35,3
AD-62107.1	29,9
AD-62066.1	33,5
AD-62072.1	27,5
AD-62078.1	49,9
AD-62084.1	117,6
AD-62090.1	44
AD-62096.1	33,5
AD-62102.1	39,2
AD-62108.1	69,5
AD-62067.1	32,3
AD-62073.1	81,1
AD-62079.1	46,8
AD-62085.1	31,6
AD-62091.1	32
AD-62097.1	35,3
AD-62103.1	35,6
AD-62109.1	24,7
AD-62115.1	25,7
AD-62121.1	23,1
AD-62127.1	36,3
AD-62133.1	50,9
AD-62139.1	84,1
AD-62145.1	90,8
AD-62151.1	56,9
AD-62110.1	26
AD-62116.1	145,5
AD-62122.1	198,7
AD-62128.1	178,4
AD-62134.1	52,4
AD-62140.1	55,6

AD-62146.1	47,2
AD-62152.1	16,4
AD-62111.1	49,3
AD-62117.1	46,2
AD-62123.1	95,1
AD-62129.1	156,2
AD-62135.1	62
AD-62141.1	128,1
AD-62147.1	146,2
AD-62153.1	35,5
AD-62112.1	43
AD-62118.1	32
AD-62124.1	48,4
AD-62130.1	49,4
AD-62136.1	141,9
AD-62142.1	38,7
AD-62148.1	165,2
AD-62154.1	94,7
AD-62113.1	52,5
AD-62119.1	44
AD-62125.1	129,9
AD-62131.1	68,9
AD-62137.1	106
AD-62143.1	176,1
AD-62149.1	201,3
AD-62155.1	143,3
AD-62114.1	22,8
AD-62120.1	34,6
AD-62126.1	44,6
AD-62132.1	39,5
AD-62138.1	34,5
AD-62144.1	28

AD-62150.1	22,1
AD-62156.1	44,1
AD-62162.1	19,8
AD-62168.1	17,3
AD-62174.1	27
AD-62180.1	15,8
AD-62186.1	20,5
AD-62192.1	33,9
AD-62198.1	14
AD-62157.1	19,3
AD-62163.1	15,4
AD-62169.1	23,6
AD-62175.1	29,6
AD-62181.1	26,4
AD-62187.1	28,8
AD-62193.1	22,9
AD-62199.1	16,4
AD-62158.1	18,5
AD-62164.1	19,1
AD-62170.1	15
AD-62176.1	62,7
AD-62182.1	70,8
AD-62188.1	81,1
AD-62194.1	63,6
AD-62200.1	21,6
AD-62159.1	42,8
AD-62165.1	27,7
AD-62171.1	31,9
AD-62177.1	29,6
AD-62183.1	25,2
AD-62189.1	32,7
AD-62195.1	73,1

AD-62201.1	35,6
AD-62160.1	56,5
AD-62166.1	115,1
AD-62172.1	107,4
AD-62178.1	71,3
AD-62184.1	27,2
AD-62190.1	37,2
AD-62196.1	19,5
AD-62202.1	19,4
AD-62161.1	23,7
AD-62167.1	24,4
AD-62173.1	36
AD-62179.1	50,5
AD-62185.1	40,5
AD-62191.1	39,3
AD-62197.1	39,4
AD-62203.1	34,1
AD-62209.1	34,6
AD-62215.1	31
AD-62221.1	16,3
AD-62227.1	68,5
AD-62233.1	34,3
AD-62239.1	37,2
AD-62245.1	31,2
AD-62204.1	33
AD-62210.1	29
AD-62216.1	38,7
AD-62222.1	34,5
AD-62228.1	30,3
AD-62234.1	15,2
AD-62240.1	26,2
AD-62246.1	40,4

AD-62205.1	17,1
AD-62211.1	20,9
AD-62217.1	49,8
AD-62223.1	40
AD-62229.1	26,7
AD-62235.1	21,5
AD-62241.1	46,2
AD-62247.1	40,4
AD-62206.1	42,2
AD-62212.1	51,7
AD-62218.1	26
AD-62224.1	40,3
AD-62230.1	32,8
AD-62236.1	52,4
AD-62242.1	33,1
AD-62248.1	18
AD-62207.1	19,7
AD-62213.1	43,4
AD-62219.1	39,8
AD-62225.1	34,3
AD-62231.1	37,2
AD-62237.1	25,9
AD-62243.1	19,8
AD-62249.1	13,8
AD-62208.1	13,7
AD-62214.1	16,6
AD-62220.1	25,2
AD-62226.1	27
AD-62232.1	36,5
AD-62238.1	51,5
AD-62244.1	31,5
AD-61874.1	27,1

AD-61880.1	30,8
AD-61886.1	30,4
AD-61892.1	48,9
AD-61898.1	24,7
AD-61904.1	125,9
AD-61910.1	45,7
AD-61916.1	25,7
AD-61875.1	33,4
AD-61881.1	64
AD-61887.1	36,7
AD-61893.1	22,9
AD-61899.1	84,5
AD-61905.1	32,1
AD-61911.1	23,7
AD-61917.1	22,1
AD-61876.1	47,3
AD-61882.1	26,5
AD-61888.1	27,7
AD-61894.1	64,8
AD-61900.1	89,8
AD-61906.1	22,4
AD-61912.1	19,8
AD-61918.1	37,1
AD-61877.1	145
AD-61883.1	31,5
AD-61889.1	33,9
AD-61895.1	37,5
AD-61901.1	26,1
AD-61907.1	33
AD-61913.1	33,1
AD-61919.1	36,6
AD-61878.1	26,9

AD-61884.1	33,9
AD-61890.1	37,2
AD-61896.1	41,7
AD-61902.1	58,6
AD-61908.1	28
AD-61914.1	31,4
AD-61920.1	27,1
AD-61879.1	33,1
AD-61885.1	33,7
AD-61891.1	41,3
AD-61897.1	39,4
AD-61903.1	51,5
AD-61909.1	48,6
AD-61915.1	122,4
AD-61921.1	66,4
AD-61927.1	40,5
AD-61933.1	27,7
AD-61939.1	28,1
AD-61945.1	30
AD-61951.1	33,7
AD-61957.1	32,6
AD-61963.1	17
AD-61922.1	32,9
AD-61928.1	28,3
AD-61934.1	24
AD-61940.1	28,2
AD-61946.1	33,2
AD-61952.1	167,9
AD-61958.1	37
AD-61964.1	30,6
AD-61923.1	51,2
AD-61929.1	29,4



AD-61935.1	61
AD-61941.1	29,5
AD-61947.1	28,9
AD-61953.1	23,7
AD-61959.1	18,9
AD-61965.1	17
AD-61924.1	24,1
AD-61930.1	31,9
AD-61936.1	36,9
AD-61942.1	13,8
AD-61948.1	40,2
AD-61954.1	41,8
AD-61960.1	24,1
AD-61966.1	18,9
AD-61925.1	52,4
AD-61931.1	25,8
AD-61937.1	19,1
AD-61943.1	27,8
AD-61949.1	26,5
AD-61955.1	83,8
AD-61961.1	26
AD-61967.1	16,3
AD-61926.1	17,8
AD-61932.1	18,6
AD-61938.1	31,9
AD-61944.1	29,5
AD-61950.1	57,8
AD-61956.1	42,1
AD-61962.1	30
AD-61968.1	29,1
AD-61974.1	50,8
AD-61980.1	19,7

AD-61986.1	36,4
AD-61992.1	36,3
AD-61998.1	18,3
AD-62004.1	14
AD-62010.1	56,8
AD-61969.1	30
AD-61975.1	51,1
AD-61981.1	37,6
AD-61987.1	32,5
AD-61993.1	23,4
AD-61999.1	43,8
AD-62005.1	23,8
AD-62011.1	32,7
AD-61970.1	39,6
AD-61976.1	27,5
AD-61982.1	64,9
AD-61988.1	29,5
AD-61994.1	40,5
AD-62006.1	42,1
AD-62012.1	21
AD-61971.1	27,1
AD-61977.1	23,4
AD-61983.1	57,5
AD-61989.1	25,8
AD-61995.1	18,2
AD-62001.1	29,7
AD-62007.1	106,4
AD-62013.1	36,1
AD-61972.1	40,5
AD-61978.1	49,1
AD-61984.1	24,3
AD-61990.1	38,8

AD-61996.1	40,5
AD-62002.1	32,5
AD-62008.1	35,3
AD-62014.1	23,6
AD-61973.1	39,3
AD-61979.1	27,4
AD-61985.1	31,3
AD-61991.1	34,9
AD-61997.1	29,2
AD-62003.1	25,9
AD-62009.1	21,1
AD-62056.1	16,3
AD-62015.1	139,3
AD-62021.1	36,4
AD-62027.1	42,4
AD-62033.1	62
AD-62039.1	35,2
AD-62045.1	30,8
AD-62051.1	22,9
AD-62057.1	31,8
AD-62016.1	29,2
AD-62022.1	36,9
AD-62028.1	52,6
AD-62034.1	31
AD-62040.1	30,7
AD-62046.1	28,2
AD-62052.1	23,7
AD-62058.1	77,9
AD-62017.1	41
AD-62023.1	27
AD-62029.1	31,8
AD-62035.1	46,4

AD-62041.1	25,3
AD-62047.1	20
AD-62053.1	37,1
AD-62059.1	31
AD-62018.1	37,8
AD-62024.1	34,7
AD-62030.1	50,4
AD-62036.1	25,5
AD-62042.1	32,5
AD-62048.1	28,3
AD-62054.1	55,6
AD-62060.1	26,9
AD-62019.1	29
AD-62025.1	78,5
AD-62031.1	152,8
AD-62037.1	27,3
AD-62043.1	33,8
AD-62049.1	46
AD-62055.1	24,5
AD-62061.1	30,5
AD-62020.1	25,1
AD-62026.1	24,9
AD-62032.1	23
AD-62038.1	21,2
AD-62044.1	34,1
AD-62050.1	22,4
AD-62320.1	16,6
AD-62326.1	16,6
AD-62332.1	15,4
AD-62338.1	41,9
AD-62344.1	19,6
AD-62350.1	32,3

AD-62356.1	20,4
AD-62362.1	27,8
AD-62321.1	18,7
AD-62327.1	14,8
AD-62333.1	22,2
AD-62339.1	134,5
AD-62345.1	32,1
AD-62351.1	35,6
AD-62357.1	31
AD-62363.1	28,2
AD-62322.1	45,1
AD-62328.1	30,1
AD-62334.1	39,1
AD-62340.1	24,3
AD-62346.1	35,4
AD-62352.1	33,8
AD-62358.1	45,7
AD-62364.1	19,7
AD-62323.1	40,5
AD-62329.1	57,5
AD-62335.1	27,6
AD-62341.1	69,2
AD-62347.1	125,9
AD-62353.1	53,1
AD-62359.1	38,1
AD-62365.1	23,6
AD-62324.1	27,1
AD-62330.1	25,1
AD-62336.1	25,3
AD-62342.1	45,4
AD-62348.1	91,6
AD-62354.1	132,1

AD-62360.1	31,6
AD-62366.1	14,2
AD-62325.1	27,9
AD-62331.1	31,5
AD-62337.1	33,9
AD-62343.1	36,1
AD-62349.1	37,6
AD-62355.1	38,8
AD-62361.1	46,1
AD-62367.1	23,6
AD-62373.1	32,1
AD-62379.1	29,6
AD-62385.1	35,7
AD-62391.1	33,7
AD-62397.1	54,1
AD-62403.1	34,8
AD-62409.1	28,2
AD-62368.1	29,7
AD-62374.1	29,6
AD-62380.1	30,6
AD-62386.1	23,4
AD-62392.1	30,5
AD-62398.1	48,7
AD-62404.1	24,8
AD-62410.1	21,9
AD-62369.1	27,4
AD-62375.1	31,9
AD-62381.1	27,3
AD-62387.1	77
AD-62393.1	93,3
AD-62399.1	150,2
AD-62405.1	28,5

AD-62411.1	19,4
AD-62370.1	16,3
AD-62376.1	48,2
AD-62382.1	28,5
AD-62388.1	49,9
AD-62394.1	29,9
AD-62400.1	45,2
AD-62406.1	23
AD-62412.1	45,5
AD-62371.1	66,5
AD-62377.1	49,5
AD-62383.1	73,8
AD-62389.1	82,4
AD-62395.1	31,8
AD-62401.1	31,2
AD-62407.1	30,2
AD-62413.1	28,1
AD-62372.1	43
AD-62378.1	17,9
AD-62384.1	29,6
AD-62390.1	37,7
AD-62396.1	26
AD-62402.1	31,6
AD-62408.1	46,6
AD-62414.1	27,2
AD-62415.1	17,6
AD-62416.1	25,3
AD-62417.1	36,3
AD-61779.2	43,2
AD-61785.2	22,5
AD-61791.2	27,3
AD-61797.2	30,5

AD-61803.2	30,9
AD-61809.2	75,1
AD-61815.2	90,7
AD-61821.2	33,7
AD-61780.2	53,5
AD-61786.2	34,4
AD-61792.2	27,5
AD-61798.2	23,3
AD-61804.2	23,6

#### Пример 7: Скрининг Дополнительных siRNA *in Vivo*

На основании последовательности AD-58643, синтезировали дополнительные четыре смысловых и три антисмысловых последовательности и применяли их для получения двенадцати, 21/25mer соединений (таблица 23). В общем, антисмысловые цепи этих соединений были расширены посредством dTdT и дуплексы содержали меньше фтор-модифицированных нуклеотидов.

Мышам линии C57BL/6 (количество=3 на группу) подкожно вводили 1 мг/кг таких GalNAc-конъюгированных дуплексов, собирали сыворотку в день 0, предварительно отбирая, и на день 5 определяли количественно уровень белков C5 с помощью ELISA. Уровни белка C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке.

Таблица 14 показывает результаты теста разовой дозы *in vivo* с указанными иРНК. Данные выражены в виде процентного отношения оставшегося белка C5 по отношению к уровням в предварительно отобранной сыворотке. Эти иРНК с улучшенной эффективностью по сравнению с исходным соединением включали AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651. Эти иРНК также демонстрировали подобную эффективность (IC<sub>50</sub> приблизительно 23-59 пМ).

Эффективность этих иРНК испытывали на мышях линии C57BL/6 с применением протокола введения разовой дозы. Мышам вводили подкожно



AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651 в дозе 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг или 2,5 мг/кг. Сыворотку собирали в дни 0 и 5 и анализировали на уровень белка C5 с помощью ELISA. Уровни C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке.

На фигуре 15 показано наличие зависимости доза-ответ со всеми тестируемыми иРНК и что разовое введение всех этих иРНК приводит к сайленсингу белка C5, аналогичному или улучшенному по сравнению с AD-58641.

Продолжительность сайленсинга AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651 *in vivo* определяли путем введения разовой дозы 1,0 мг/кг мышам линии C57BL/6 и определением количества белка C5, обнаруживаемого в дни 6, 13, 20, 27 и 34 с помощью ELISA. Уровни C5 были нормализованы до уровня в день 0 в предварительно отобранной сыворотке.

Как показано на фигуре 16, каждая из испытуемых иРНК демонстрирует ту же кинетику восстановления, что и AD-62643, с тенденцией к лучшему сайленсингу, но в пределах погрешности анализа.

AD-62510, AD-62643, AD-62645, AD-62646, AD-62650 и AD-62651 дополнительно испытывали на эффективность и оценивали кумулятивный эффект иРНК у крыс с применением протокола повторных введений. Крысам линии Sprague Dawley дикого типа производили подкожную инъекцию с каждой из иРНК в дозе 5,0 мг/кг/дозу на день 0, 4 и 7. Сыворотку собирали на день 0, 4, 7, 11, 14, 18, 25, 28 и 32. Гемолитическую активность сыворотки количественно оценивали, как описано выше.

Результаты, представленные на фигуре 17, показывают, что все из испытанных иРНК обеспечивают эффективное и продолжительное снижение гемолитической активности и аналогичное восстановление гемолиза, наблюдаемые при обработке AD-58641.

Последовательности Модифицированной Смысловой и Антисмысловой Цепи GalNAc-конъюгированных dsRNA C5

ID дуплекса	ID СМЫСЛОВОЙ	СМЫСЛОВАЯ (от 5' к 3')	SEQ ID NO:	AS ID	АНТИСМЫСЛОВАЯ (от 5' к 3')	SEQ ID NO:
AD-58643	A-119326.1	AfsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfaUfaAfuAfL96	2873	A-119327.1	usAfsuUfaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcUfususu	2886
AD-62642	A-125167.7	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfauaL96	2874	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2887
AD-62510	A-125167.7	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfauaL96	2875	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfAfaAfauaUfcUfuGfcususudTdT	2888
AD-62643	A-125167.7	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfauaL96	2876	A-125647.1	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2889
AD-62644	A-125157.17	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuafuaL96	2877	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2890
AD-62645	A-125157.17	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuafuaL96	2878	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfAfaAfauaUfcUfuGfcususudTdT	2891
AD-62646	A-125157.17	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuafuaL96	2879	A-125647.1	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2892
AD-62647	A-125134.1	asasgcaagauaUfuuuua (Tgn) auaL96	2880	A-125139.1	usAfsuuaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	2893
AD-62648	A-125134.1	asasgcaagauaUfuuuua (Tgn) auaL96	2881	A-125173.2	usAfsUfuAfuAfAfaAfauaUfcUfuGfcususudTdT	2894

AD-62649	A-125134.1	asasgcaagauaUfuuuua (Tgn) aau aL96	2882	A- 125647.1	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuu susudTdT	2895
AD-62428	A-125127.2	asasgcaagaUfaUfuuuuauaauaL9 6	2883	A- 125139.1	usAfsuaaUfaAfaAfauaUfcUfuGfcuus usudTdT	2896
AD-62650	A-125127.2	asasgcaagaUfaUfuuuuauaauaL9 6	2884	A- 125173.2	usAfsUfuAfuAfAfaAfauaUfcUfuGfcu ususudTdT	2897
AD-62651	A-125127.2	asasgcaagaUfaUfuuuuauaauaL9 6	2885	A- 125647.1	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuu susudTdT	2898

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Средство, представляющее собой двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (dsRNA), для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где указанная dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5.

2. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 1, где смысловая и антисмысловая цепи содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из последовательностей в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23.

3. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 1 или 2, где указанная dsRNA включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

4. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 3, где все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи включают модификацию.

5. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 3 или 4, где по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситимин (dT) нуклеотида, 2'-O-метил модифицированного нуклеотида, 2'-фтор модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида морфолино, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего основание не природного происхождения, нуклеотида, содержащего 5'-фосфоротиоатную группу, и концевого нуклеотида, связанного с холестерильным производным или группой бисдециламида додекановой кислоты.

6. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-5, где каждая цепь составляет не более 30 нуклеотидов в длину.

7. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере 1 нуклеотида.

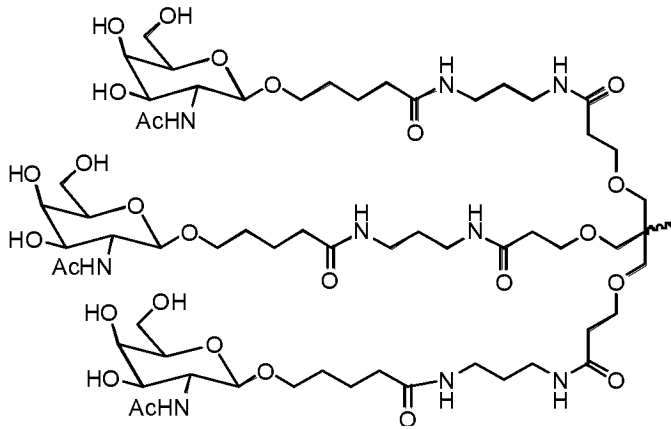
8. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащее лиганд.

9. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где лиганд конъюгируется с 3'-концом смысловой цепи средства, представляющего собой dsRNA.

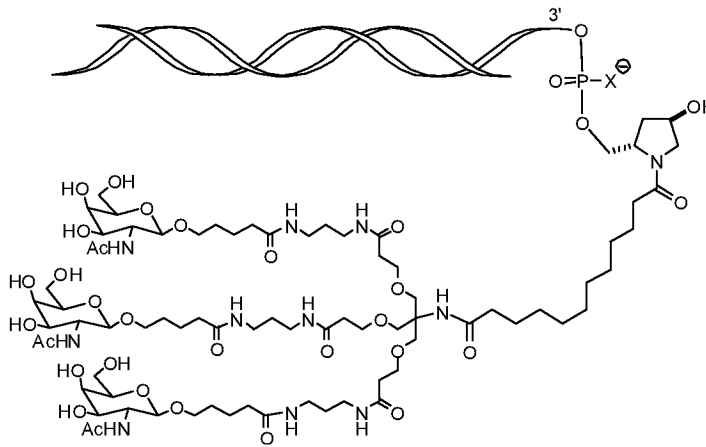
10. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8 или 9, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

11. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8 или 9, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

12. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 10 или 11, где лиганд представляет собой



13. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 12, где средство, представляющее собой dsRNA, конъюгируется с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

14. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 13, где X представляет собой O.

15. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-14, где двухцепочечный участок состоит из 15-30 пар нуклеотидов в длину.

16. Средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-15, где указанное средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

17. Двухцепочечное средство RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C5, где указанное двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок,

где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, и отличается не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5,

где по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил модификации и 2'-фтор модификации,

где указанная смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

где по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из

2'-O-метил-модификации и 2'-фтор модификации,

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

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

18. Клетка, содержащая средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-16 или двухцепочечное средство RNAi по п.17.

19. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента C5, содержащее средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-16 или двухцепочечное средство RNAi по п.17.

20. Способ ингибирования экспрессии компонента комплемента C5 в клетке, включающий:

(a) приведение клетки в контакт со средством, представляющим собой dsRNA, по любому из пп. 1-16, двухцепочечным средством RNAi по п. 17 или фармацевтической композицией по п. 19; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a) в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена компонента комплемента C5 с ингибированием тем самым экспрессии гена компонента комплемента C5 в клетке.

21. Способ лечения субъекта с заболеванием или нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C5 окажет благоприятное воздействие, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, представляющего собой dsRNA, по любому из пп. 1-16, двухцепочечного средства RNAi по п. 17 или фармацевтической композиции по п. 19, с лечением тем самым указанного субъекта.

22. Способ по п. 21, в котором нарушение представляет собой заболевание, связанное с компонентом комплемента C5.

23. Способ по п. 22, заболевание, связанное с компонентом

комплемента C5, выбрано из группы, состоящей из ночной пароксизмальной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (RA), синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS), болезни плотного осадка (DDD), оптиконевромиелимита (NMO), мультифокальной моторной нейропатии (MMN), рассеянного склероза (MS); дегенерации желтого пятна (например, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD)); синдрома, включающего гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP); пурпуры тромботической тромбоцитопенической (TTP); спонтанной потери плода; пауци-иммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении гравис, болезни холодových агглютининов, дерматомиозита буллезного пемфигоида, связанного с Шига-подобным токсином E. coli гемолитико-уремического синдрома, С3-нефропатии, васкулита, связанного с антителами к цитоплазме нейтрофилов; реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальным и сосудистым механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, аллогенной трансплантации, сепсиса, заболевания коронарной артерии, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, сепсиса, связанного с системным воспалительным ответом, септического шока, травмы спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии (AIHA), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистых нарушений, миокардита, цереброваскулярного нарушения, периферического сосудистого нарушения, реноваскулярного нарушения, нарушения брыжеечных/кишечных сосудов, васкулита, нефрита Шенлейна-Геноха, васкулита, связанного с системной красной волчанкой, васкулита, связанного с ревматоидным артритом, васкулита, связанного с иммунными комплексами, болезни Такаясу,

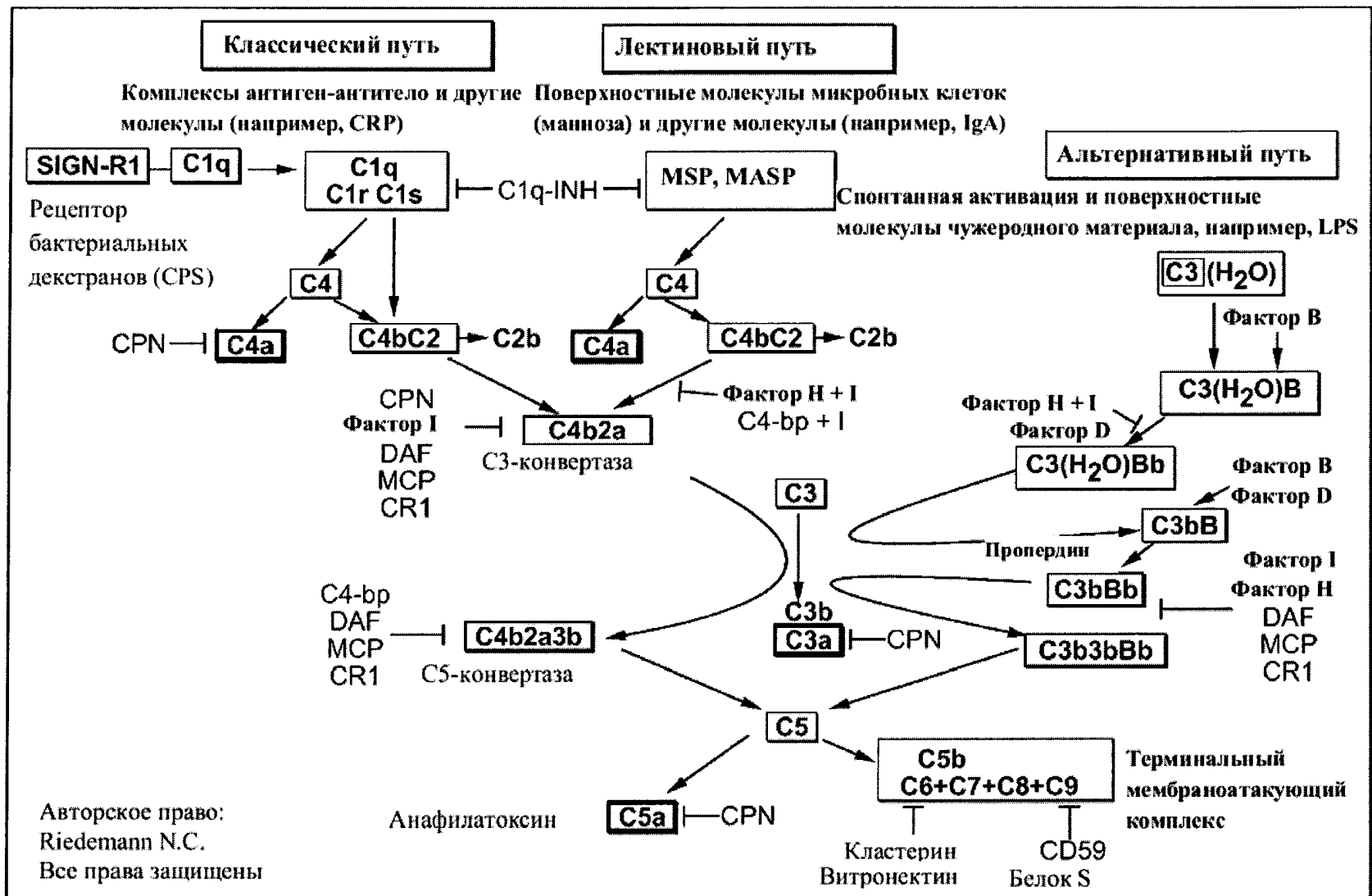


дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, вращательной атерэктомии, перепончатой нефропатии, синдрома Гийена-Барре и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA).

24. Способ по любому из пп. 21-23, в котором субъектом является человек.

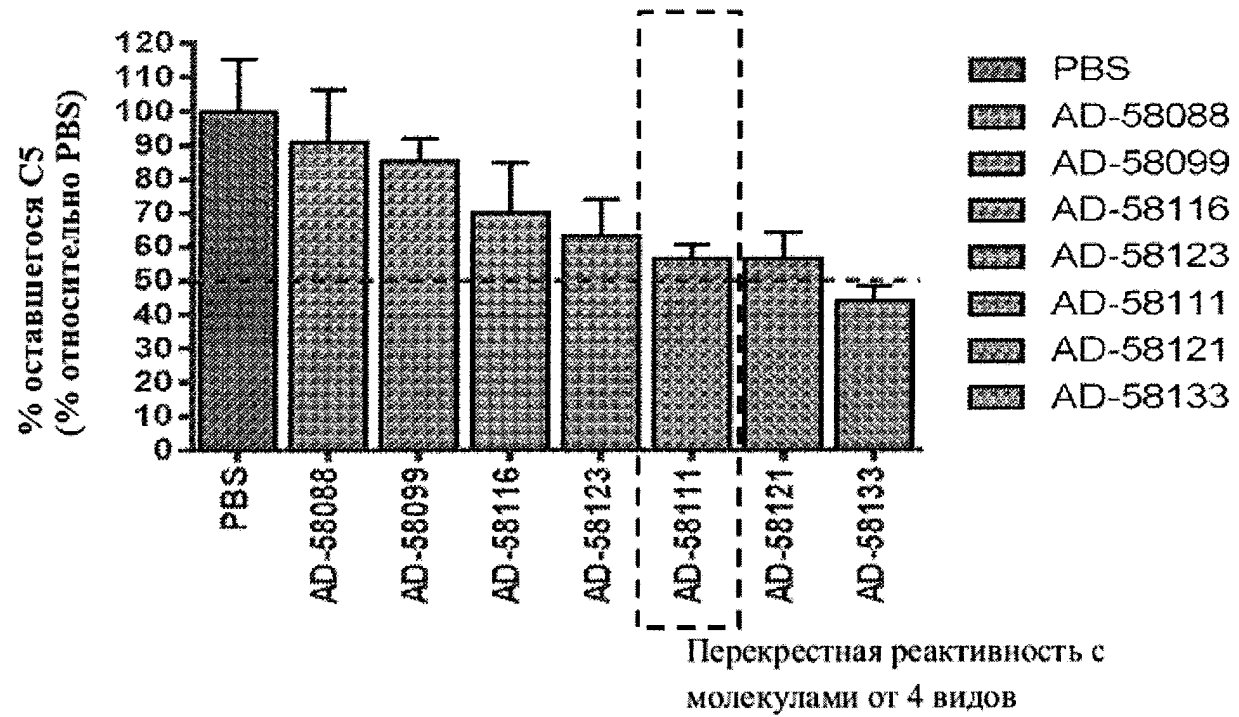
25. Способ по любому из пп. 21-24, в котором средство, представляющее собой dsRNA, вводят субъекту подкожно.

По доверенности

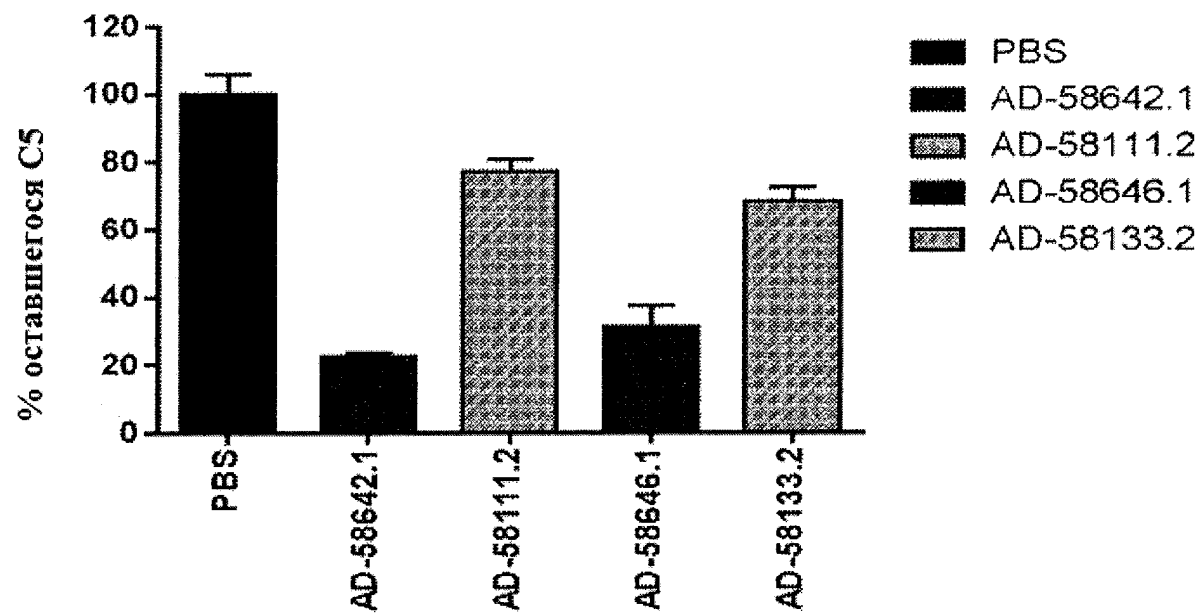


Фигура 1

### Уровни мРНК C5

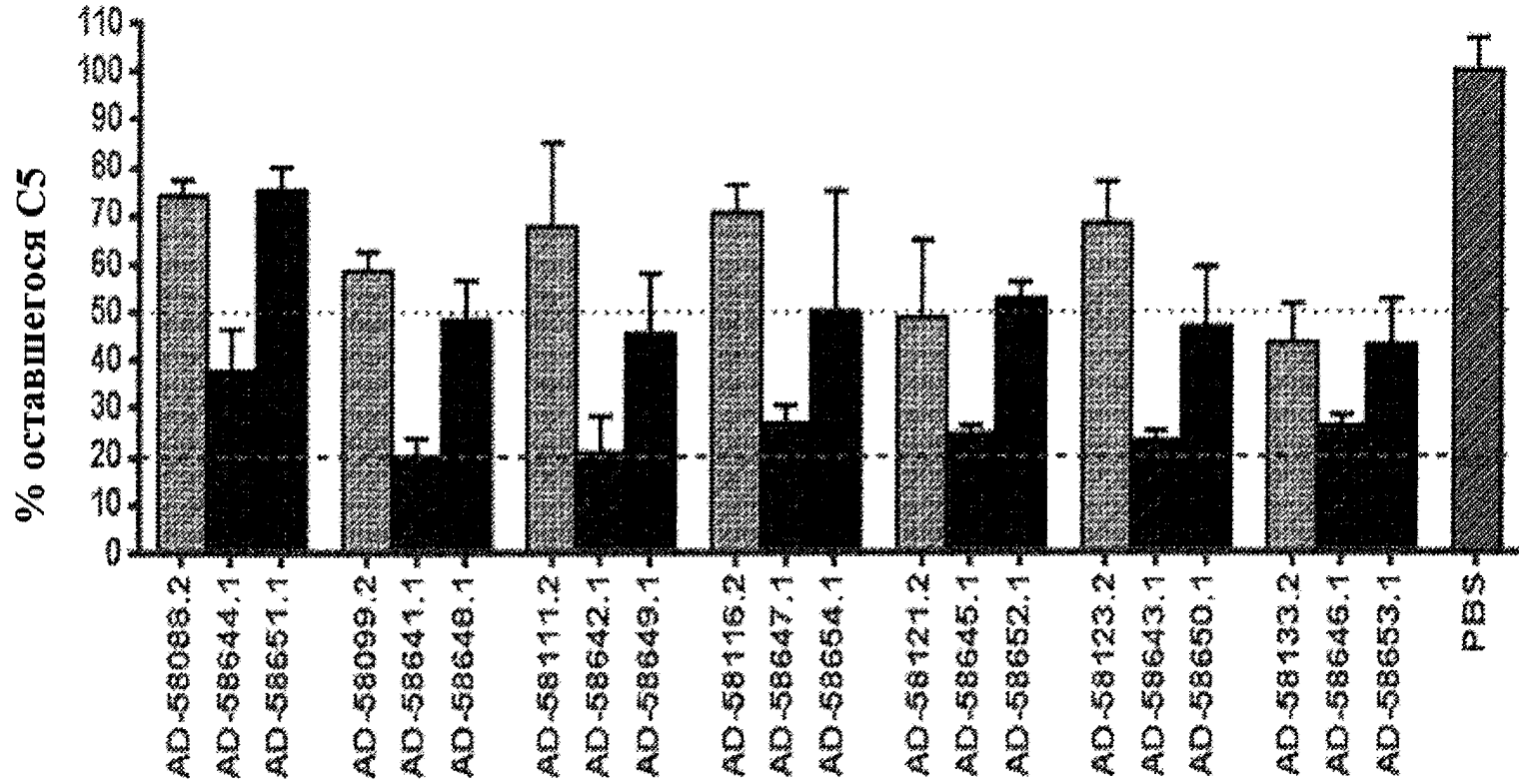


Фигура 2



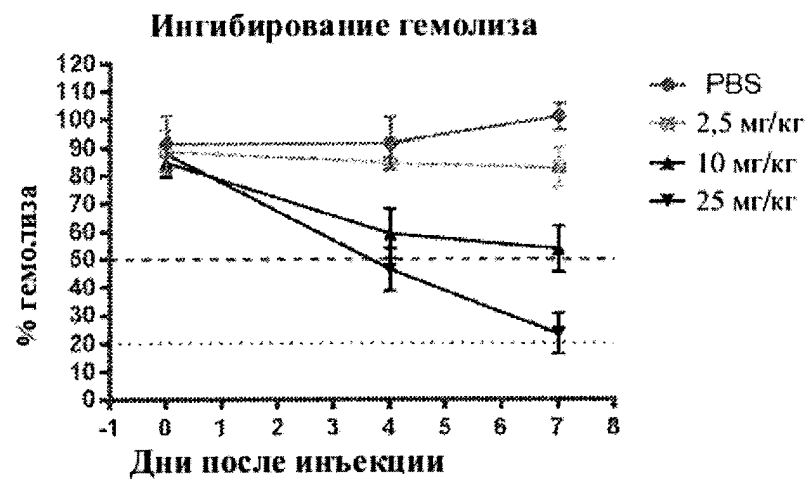
Фигура 3

*In vivo* введение конъюгата на основе GalNAc для C5

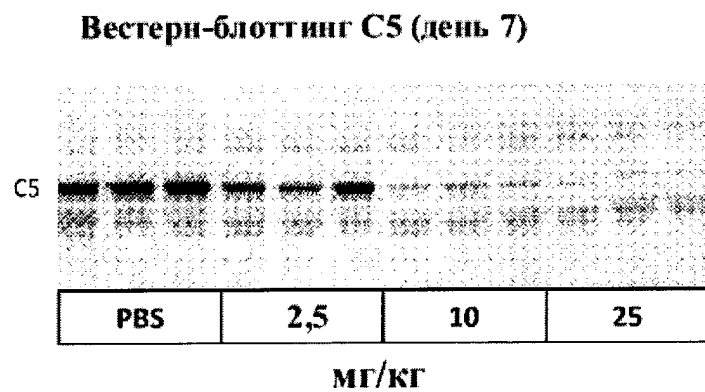


Фигура 4

A.

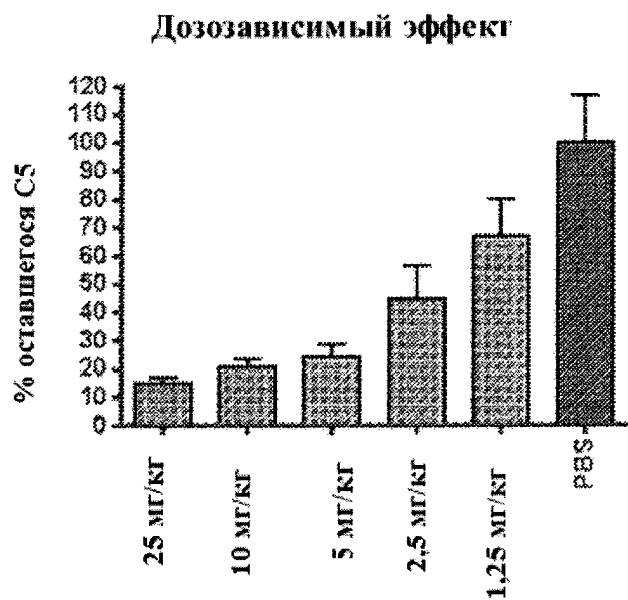


B.



**Фигура 5**

A.



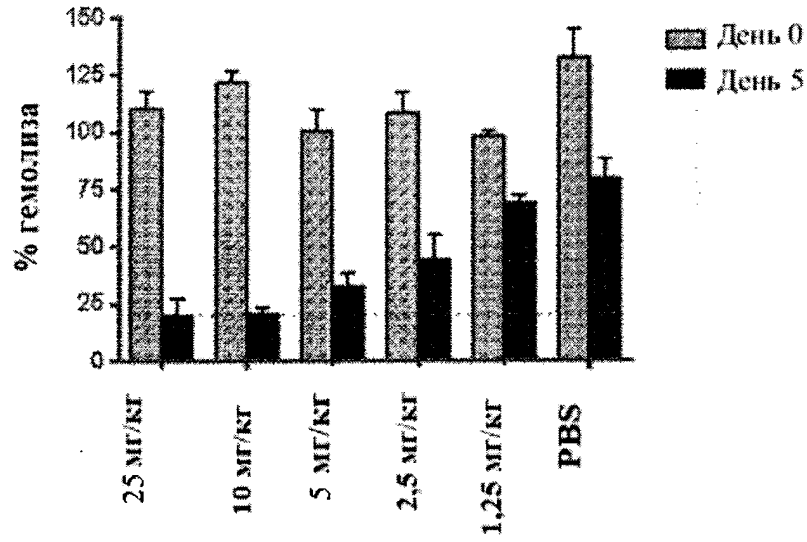
B.



Фигура 6

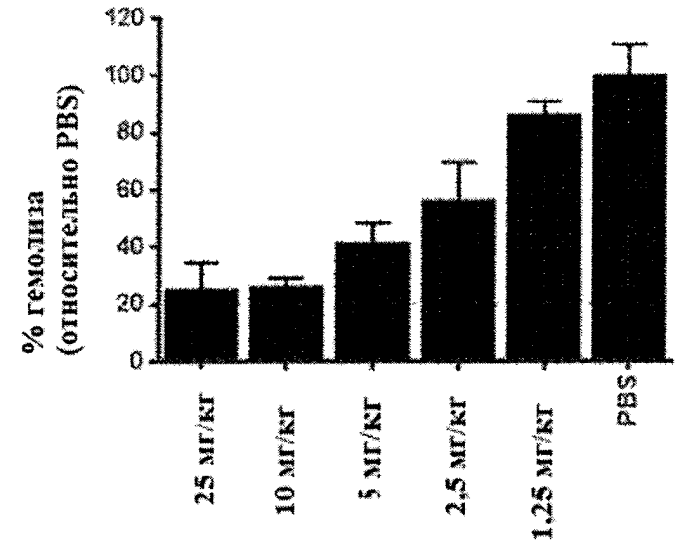
A.

### Анализ гемоллиза



B.

### Гемоллиз RBC

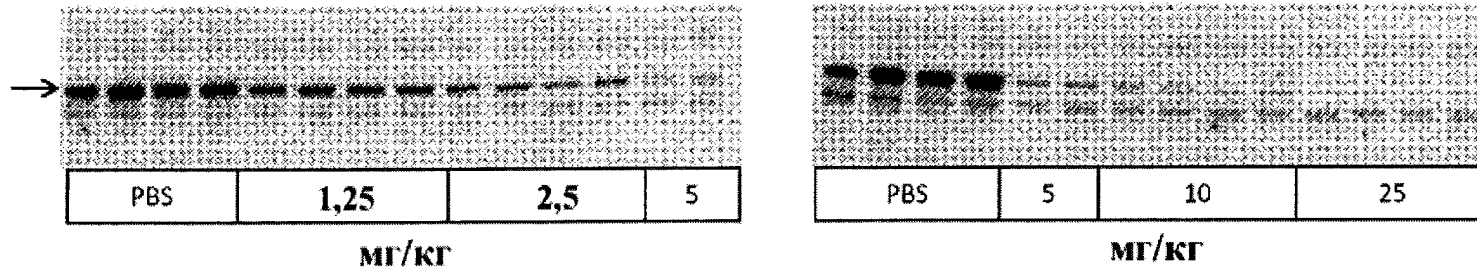


Фигура 7

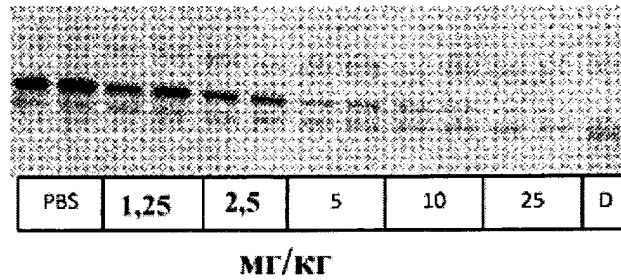


**Сайленсинг гена белка C5 (4 мыши из каждой группы)**

Образцы в день 5

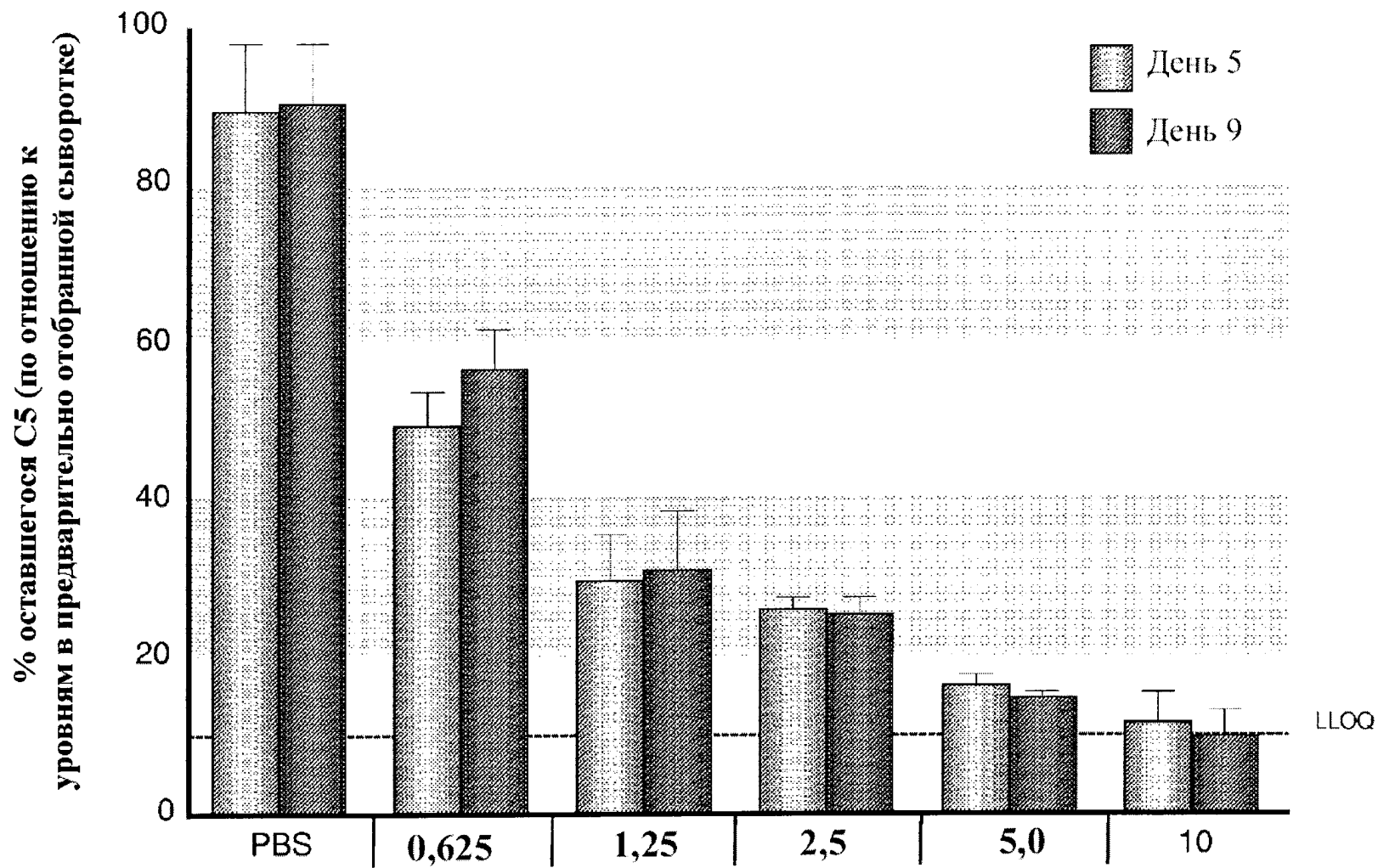


**Сайленсинг гена белка C5 (2 мыши из каждой группы)**

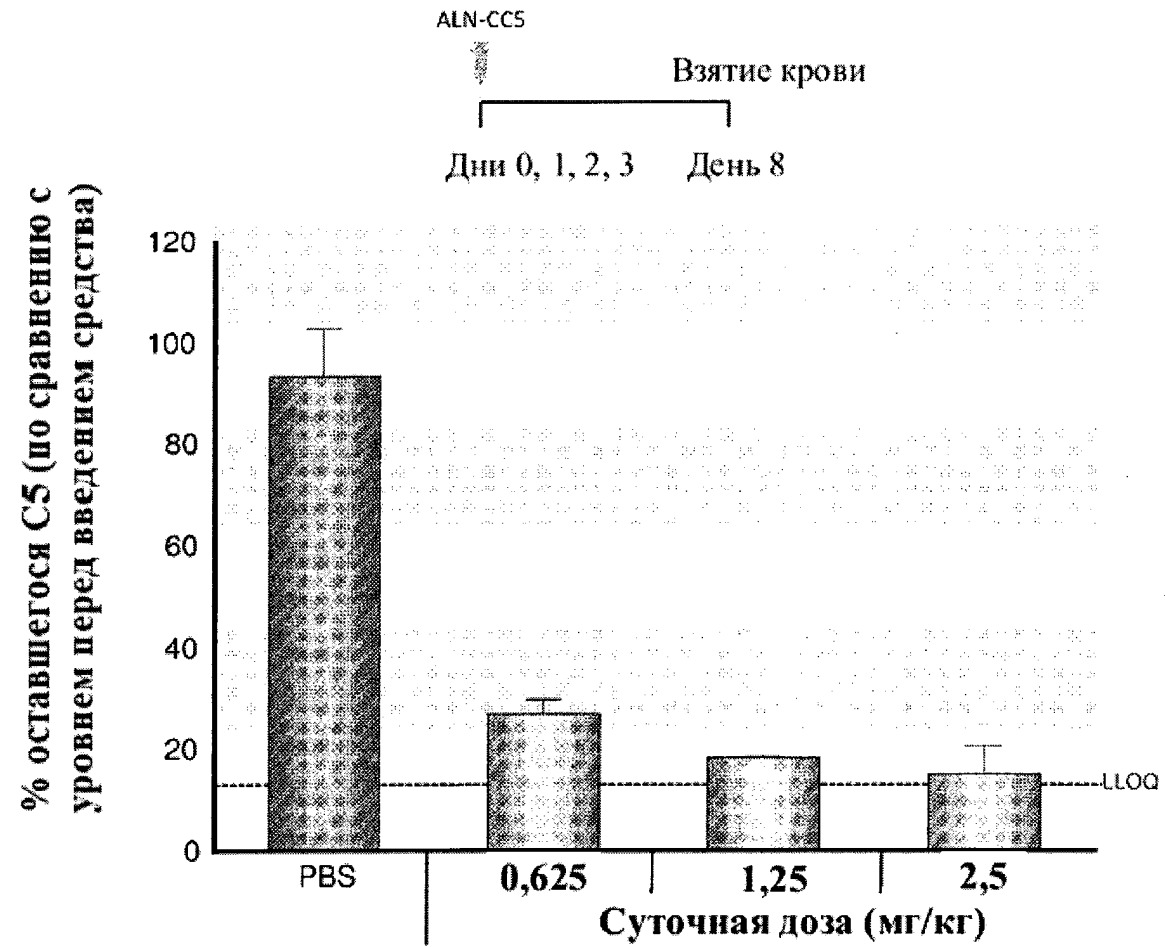


D – сыворотка крови, лишенная C5 (DBA/2)

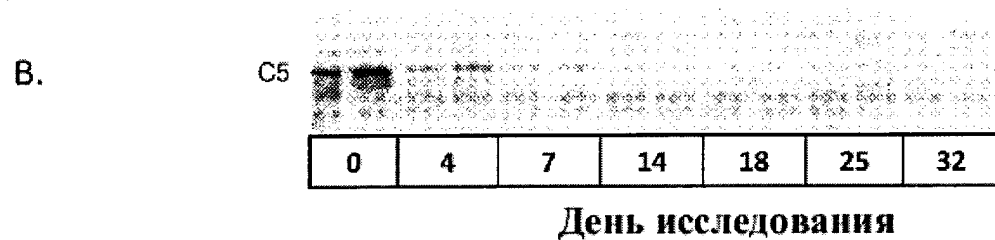
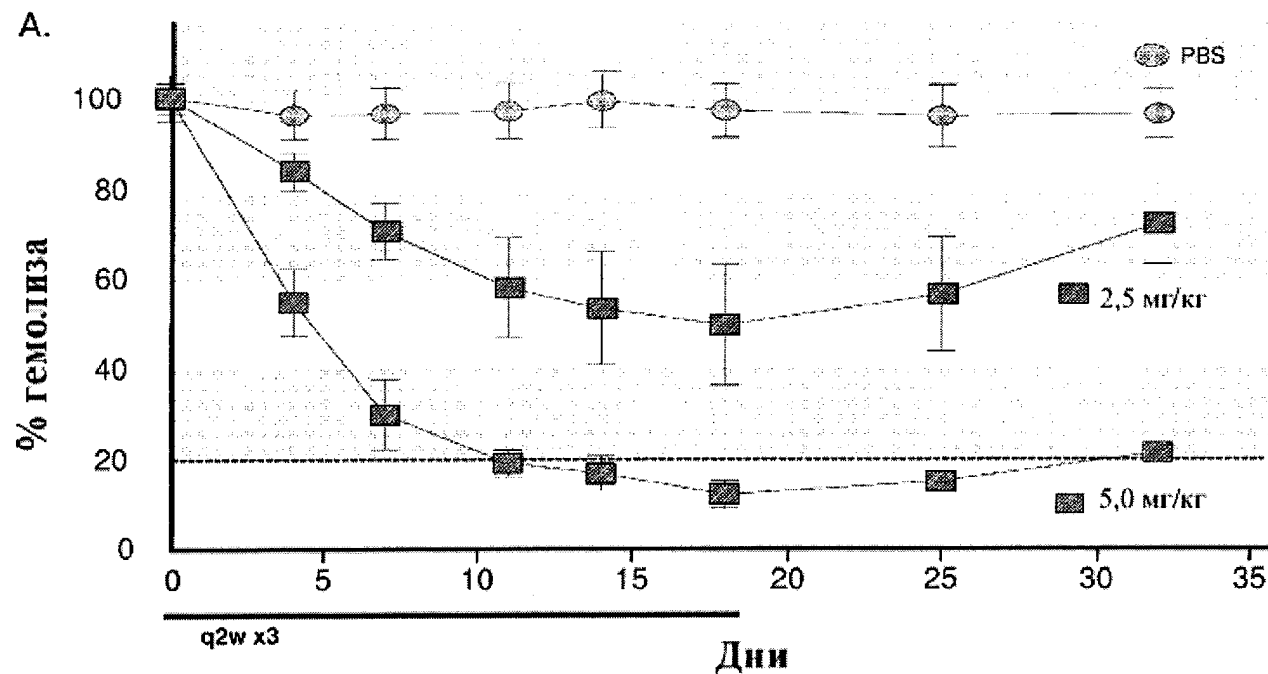
**Фигура 8**



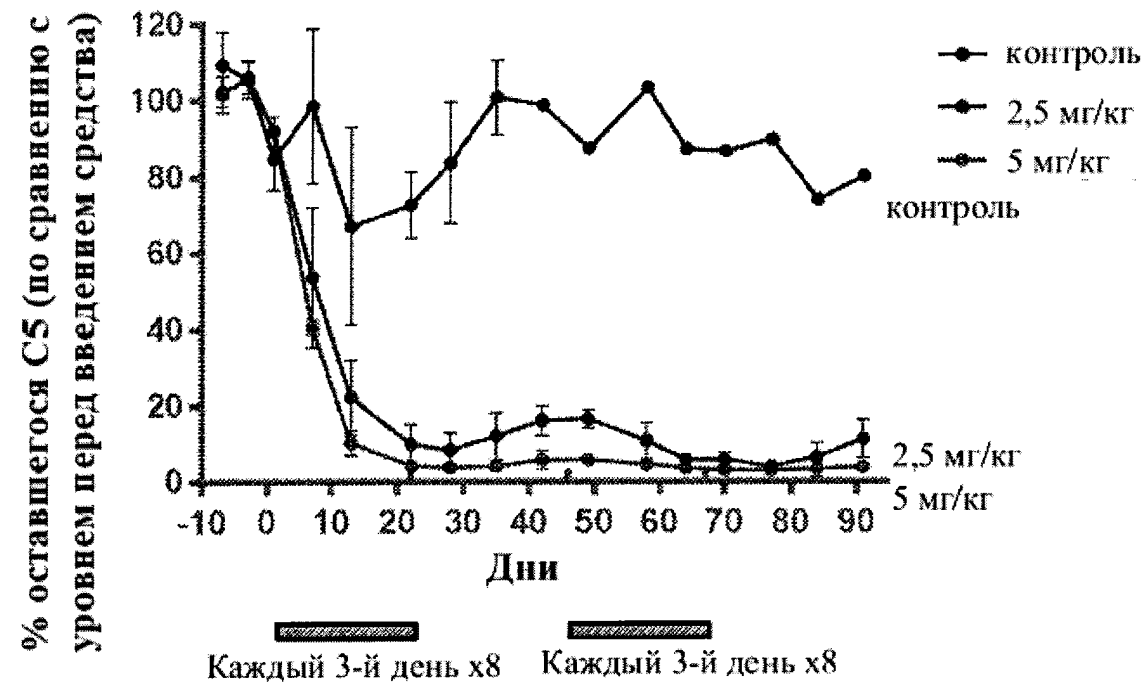
Фигура 9



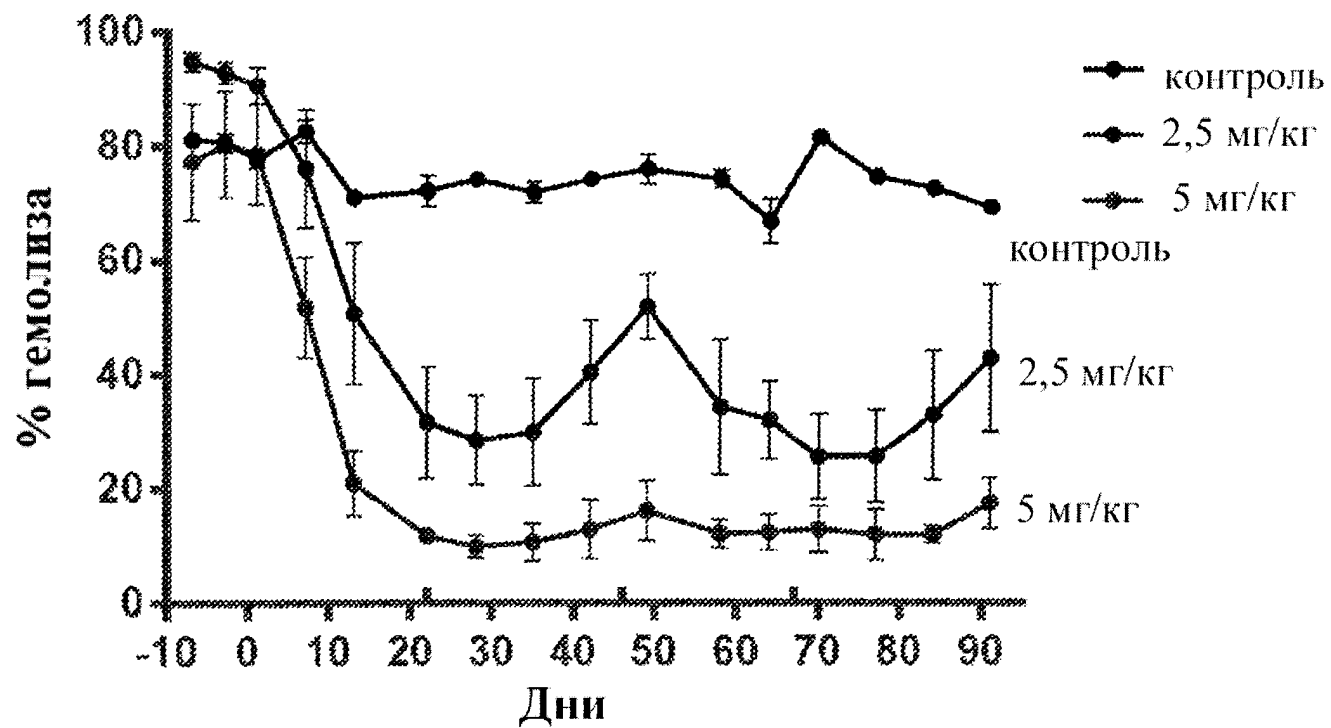
Фигура 10



Фигура 11

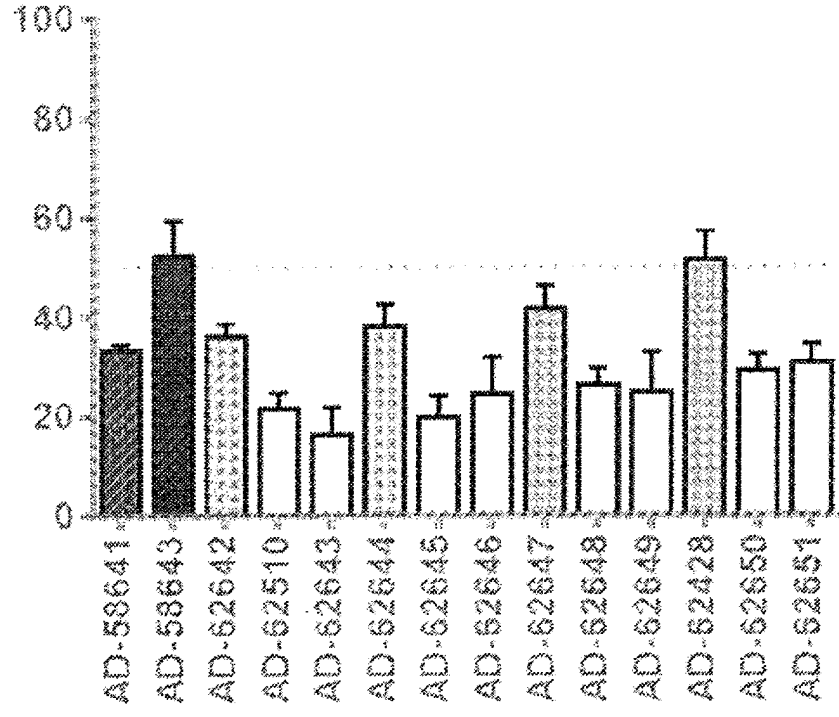


Фигура 12

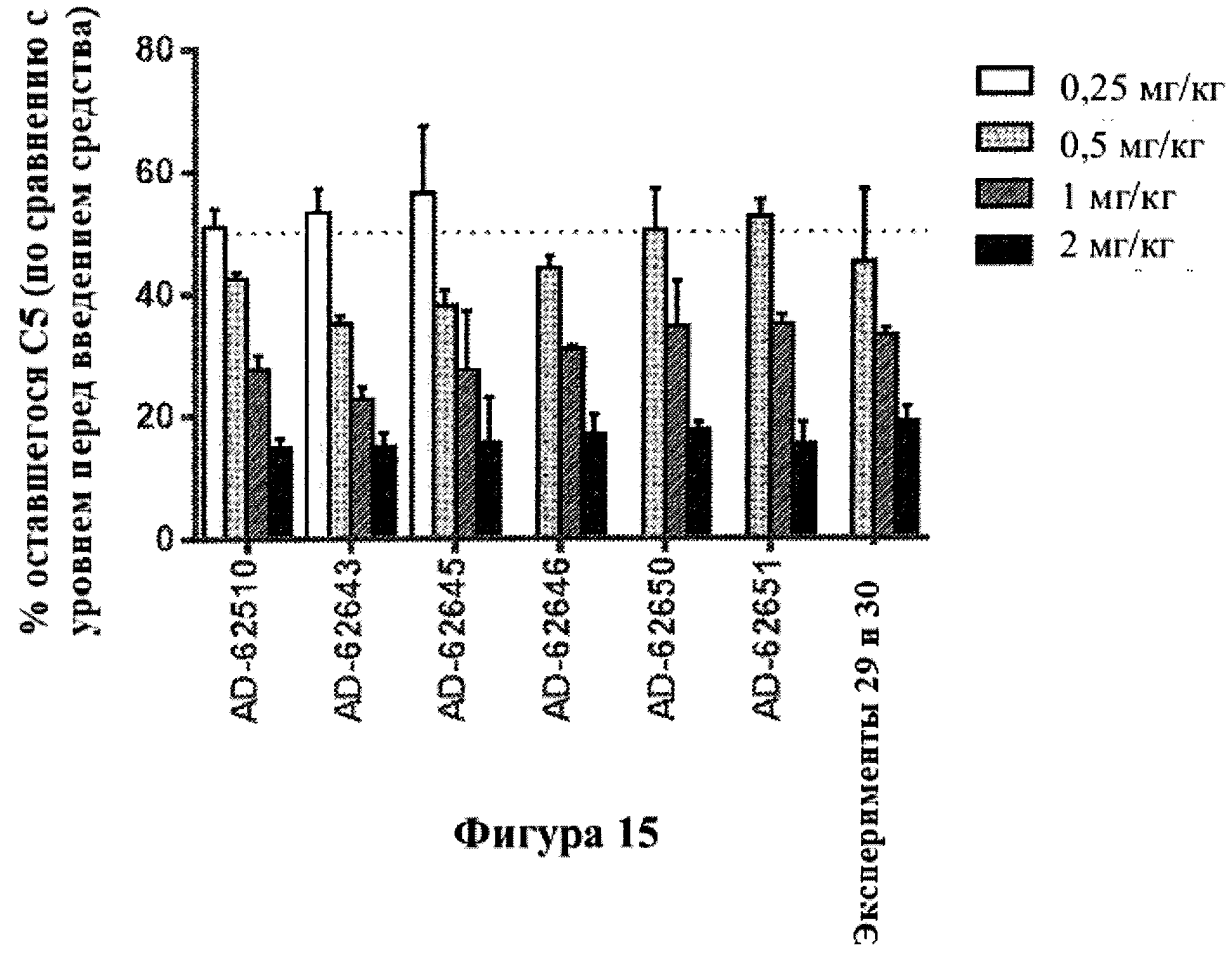


Фигура 13

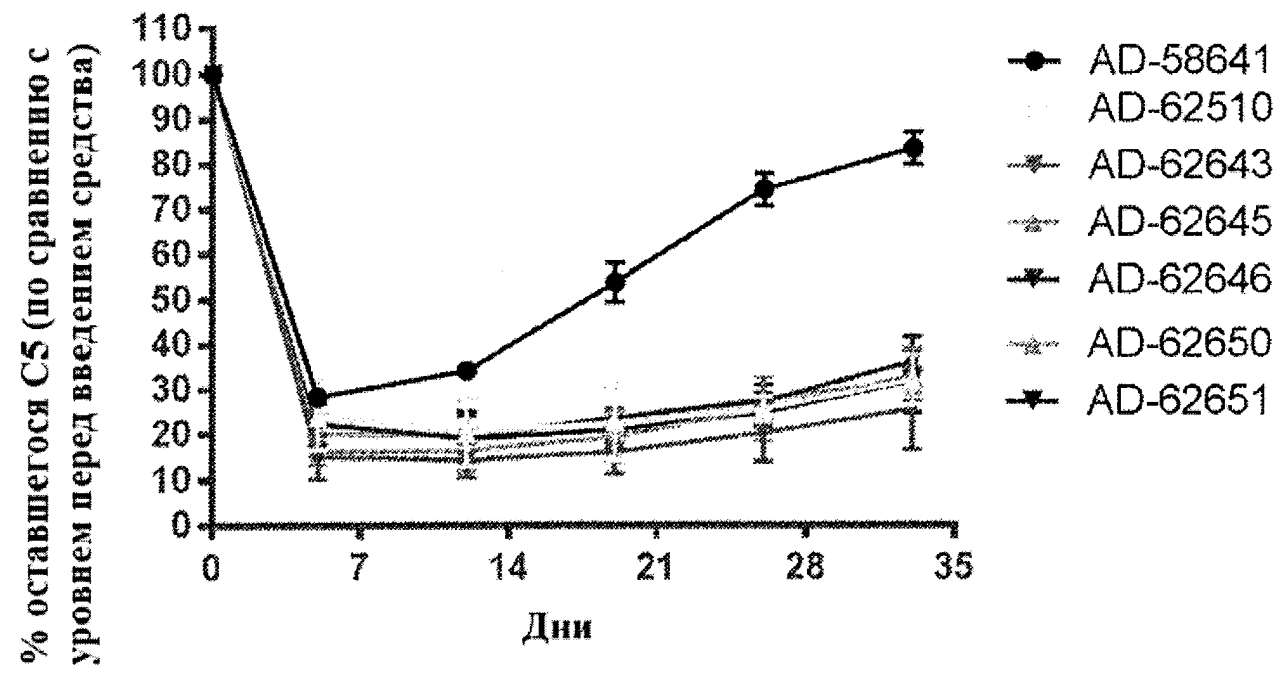
**% оставшегося С5 (по сравнению с  
уровнем перед введением средства)**



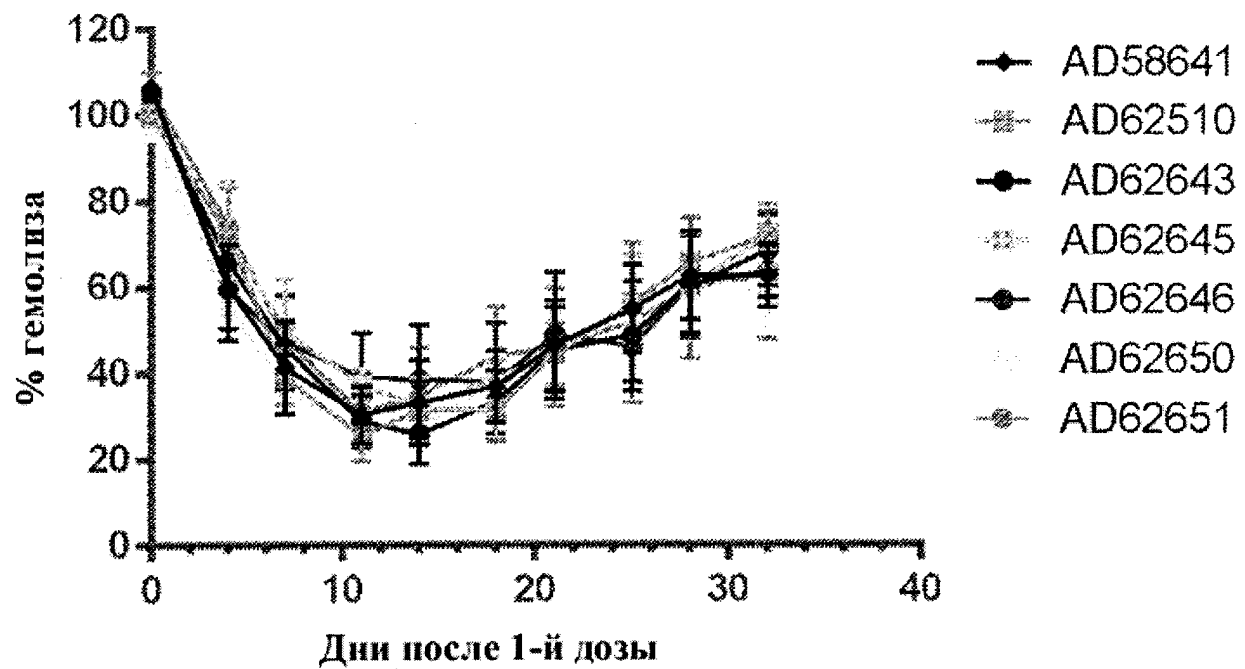
**Фигура 14**







Фигура 16



Фигура 17

SEQ ID NO:1

>gi|38016946| эталонная последовательность | NM\_001735.2 | компонент 5 системы комплемента Homo sapiens (C5),  
 mRNATATATCCGTTGGTTTCCTGCTACCTCCAACCATGGGCCTTTGGGAATACCTTGTGTTTTTAATCTTCCTGGGGAAAACCTGGGGACAGGAGC  
 AACATATGTCATTTCCAGCACAAAATATTCCTGTTGGAGCACTCTGAAAATATGTTGATTCAGTTTATGGATACACTGAAGCATTTGATGCA  
 ACAATCTCTATTAAGATATCCTGATAAAAAATTTAGTTACTCCTCAGGCCATGTTTCATTTATCCTCAGAGAATAAATTCAAAACCTCTGCAAT  
 CTTAACAATACAACAAAACAATTCCTGGAGGACAAAACCCAGTTTCTTATGTGATTTTGGAAAGTTGATCAAAAGCATTTTTTCAAATCAAAAA  
 GAATGCCAATAACCTATGACAAATGGATTTCCTTCACTTACATACAGACAAAACCTGTTTATACTCCAGACCAGTCAGTAAAAGTTAGAGTTTATTTCG  
 TTGAATGACGACTTGAAGCCAGCCAAAAGAGAACTGTCTTAACTTTTCAATAGATCCTGAAGGATCAGAAGTTGACATGGTAGAAGAAATTTGATCA  
 TATTGGAAATATCTCTTTTCTGACTTCAAGATTCCTGCTAATCTTAGATATGGTATGTTGGACGATCAAGGCTAAATATAAAGAGGACTTTTCAA  
 CAACTGGAACCCGATATTTTGAAGTTAAAGAATATGCTCTGCCACATTTTCTGCTCAATCGAGCCAGAAATAAATTTCAATGGTTACAGAAGC  
 TTTAAGAATTTTGAATTAATAAAGCAAGATATTTTATAAATAAGTAGTCACTGAGGCTGACGTTTATATACATTTTGGAAATAAGAGAAGA  
 CTTAAAAGATGATCAAAAAGAAATGATGCAAAACAGCAATGCAAAACACAATGTTGATAAAATGGAATGCTCAAGTCACATTTGATTCTGAAACAG  
 CAGTCAAAGAACTGTCACTACAGTTTAGAAGATTTAAACAACAAGTACCTTTTATATTGCTGTAACAGTCAATAGAGTCTCAGGTTGGATTTCT  
 GAAGAGGCAGAAAACCTGGCATCAAATATGCTCTCTCCCTACAACCTGAATTTGGTTGCTACTCCTCTTTTCTGAAGCCTGGGATTTCCATA  
 TCCCATCAAGGTGACAGTTAAAGATTCGCTTGGCCAGTTGGTAGGAGGAGTCCAGTAACACTGAATGCAACAAATGATGTAACCAAGAGA  
 CACTGACTTGGATCCAAGCAAAAGTGTAAACAGTGTGATGATGGAGTAGCTTCTTTGCTTAACTCTCCATCTGGAGTGACGGTGTCTGGAG  
 TTTAATGTCAAAAACCTGATGCTCCAGATCTTCCAGAAGAAAATCAGGCCAGGGAAGGTTACCAGCAATAGCATACATCTCTCAGCCAAAGTTA  
 CCTTTATATTGATGGACTGATAACCATAAGGCTTTGCTAGTGGGAGAACATCTGAATATTATTGTTACCCCCAAAAGCCCATATATTGACAAAA  
 TAACTCACATATAATTAATCTGATTTTATCCAAGGCCAAAATATCCACTTTGGCAGGAGGAGAAAATTTTCAGATGCATCTTATCAAAGTATAAAC  
 ATTCCAGTAACACAGAACATGGTTCTTCATCCCGACTCTGGTCTATTACATCTGTCACAGGAGAACAGACAGCAGCAATAGTGTCTGATTCACT  
 CTGGTTAAATATTGAAGAAAATGTTGGCAACCCAGCTCCAGGTTCACTGCTCTCTGATGCAATGCAATATCTCCAGGCCAAAACCTGTGCTCTTA  
 ATATGGCAACTGGAAATGGATTCTGGGTGGCATTAGCAGCAGTGGACAGTGTCTGTGATGGAGTCCAAAGAGGAGCCAAAAGCCCTTGGAAAGA  
 GTATTTCAATCTTAGAGAAGAGTGTATCTGGGCCTGGGAGGAGTGGTGGCCCAACAATGCCAATGTTGTTCCACCTAGCTGGACTTACCTTCT  
 CACTAATGCAAAATGCAGATGACTCCCAAGAAAATGATGAACCTTGTAAAGAAAATTTCCAGGCCAAGAAGACGCTGCCAAAAGAAGATAGAAGAA  
 TAGCTGTAAATATAAACAATTCAGTAGTGAAGAAAATGTTGTTACGATGGAGCCTCGCTTAAATATGATGAAACCTGTGAGCAGCGAGCTGCACGG  
 ATTAGTTTAGGGCCAAGATGCATCAAAGCTTTCACTGAATGTTGTTGCTGCGCAAGCCAGCTCCGTTGCTAATATCTCTATAAAGACATGCAAT  
 GGAAGGCTACACATGAAGACCTGTTTACCAGTAAGCAAGCCAGAAAATTCGGAGTTATTTCCAGAAGCTGGTTGTGGGAAGTTTCACTTGTTC  
 CCAGAAGAAAACAGTTGCAGTTTGGCCTACCTGATTCTCTAACCCACTGGGAAATTCAGGCGTTGGCATTTCAAACACTGGTATATGTTGCT  
 GATACTGTCAAGGCCAAAGGTGTTCAAAGATGCTTCCCGAAAATGAATATACCATATCTGTTGTACGAGGAGAACAGATCCAATGAAAGGAAC  
 TGTTTACAACATATAGGACTTCTGGGATGCAGTTCTGTGTTAAAATGCTCTGCTGTGGAGGGAATCTGCACTTCGGAAGCCAGTCAATGATCAT  
 AGGCCACAAGTCTCCAAATGTTGTCGCCAGAAAGTAGAGGGCTCCCTCAGTCACTTGGTGACATTCAGTGTCTTCTCTGAAATGGCCCTT  
 CACAACATCAATTTTCACTGGAGACTTGGTTTGGAAAAGAAAATCTTAGTAAAACATTTACGAGTGGTGGCAGAAAGGTTCAAAAAGGGAAGCTA  
 TTCTGGTGTACTTTGGATCCTAGGGGTATTTATGGTACCATTAGCAGACGAAAGGAGTTCCCATACAGGATACCCCTAGATTTGGTCCCCAAA  
 CAGAAATCAAAGGATTTTGAAGTAAAGGACTGCTTGTAGGTGAGATCTTGTCTGCAGTTCTAAGTCAGGAAGGCATCAATATCCTAACCCAC  
 CTCCCAAAAGGGAGTGCAGAGGCCGAGCTGATGAGCGTTGTCCAGTATCTATGTTTTCACTACCTGGAAACAGGAAATCATTTGGAACATTTT  
 TCAATCTGACCCATTAATTTGAAAAGCAGAAAACCTGAAGAAAATTTAAAAGAAAGGATGTTGAGCATTATGTTCTACAGAAATGCTGACTACTTT  
 ACAGTGTGTTGAAGGGTGAAGTGTCTAGCACTTGGTTAACAGCTTTTGTCTTAAAGAGTACTTGGACAAGTAAATATAATACGTAGCAGAAACAA  
 AATTCATTTGTAATCTTTATTTGGTGTAGTTGAGAATATCAATTAGATAATGGATCTTTCAAGGAAAATTCACAGTATCAACCAATAAAAT  
 ACAGGGTACCTTGCCTGTTGAAGCCCGAGAGAACAGCTTATATCTTACAGCCTTACTGTGATTGGAATTAGAAAAGGCTTTGATATATGCCCC  
 TGGTGAATAACGACAGCTCTAATTAAGCTGACAACCTTCTGCTTGAATAACACTGCCAGCCAGAGCACCTTTACATGGCCATTTCTGCG  
 TATGCTCTTTCCCTGGGAGATAAAAACCTCACCCACAGTTTCGTTCAATTTGTTTTCAGCTTTGAAAGAGAGAAGCTTTGGTTAAAGGTAATCCACCCAT  
 TTATCGTTTTTGGAAAGACAATCTTCAGCATAAAGACAGCTCTGTACCTAACACTGGTACGGCAGTATGGTAGAATGCAAGTACAAAGCCACAGGGAAGA  
 ICACCAGTCTGAACTTGAAGATATAAATATGTTAACCCAGTCAATAATGGCTATCAGAAGAGCAGAGGTATGGAGGTGGCTTTTATTCACCC  
 CAGGACACAATCAATGCCATTGAGGGCTGACGGGAATATTCACCTCTGGTTAAACAACCTCCGCTTGAGTATGGACATCGATGTTTCTTACAGCA  
 TAAAGGTGCCCTTACATAATATAAAATGACAGACAAGAAATTCCTTGGGAGGCCAGTAGAGGTGCTTCTCAATGATGACCTCATTGTCAGTACAG  
 GATTGGCAGTGGCTTGGCTACAGTACATGTAACAACCTGTAGTTACAAAACCCAGTACCCTGAGGAAGTTGCAAGCTTTTATTTGAAAATCGAT  
 ACTCAGGATATTGAAGCATCCCACTACAGAGGCTACGGAACCTGTGATTACAAACGCATAGTAGCATGTGCCAGCTACAAGCCACAGGGAAGA  
 ATCATCATCTGGATCCTCTCAATGCGGTGATGGACATCTCTTGGCTACTGGAATCAGTGAATAAAGAACTTAAAAGCCCTTGTGGAAGGGG  
 TGGATCAACTATTCAGTATTACCAAAATCAAAGATGGACATGTTATCTGCAACTGAATTCGATTCCTCCAGTGTATTCCTTTGTTGATGATTC  
 CGGATATTGAACTCTTTGAAGTTGGGTTTCTCAGTCTGCCACTTTCCAGTGTACGAAATACCACAGACCAGATAAACAGTGTACCATGTTTAA  
 TAGCACTTCCAATATCAAATTCAGAAAAGTCTGTGAAGGAGCCGCTGCAAGTGTGTAGAAGCTGATTTGGGCAATGCAGGAAGAATGGATC  
 TGACAATCTCTGCAGAGACAAGAAAACAACAGCATGTAACCAGAGATGTCATATGCTTATAAAGTTAGCATCACATCCATCACTGTAGAAAAT  
 GTTTTGTCAAGTACAAGGCAACCCCTTCTGGATATCTACAAAACCTGGGGAAGCTGTGCTGAGAAGACTCTGAGATTACCTTCATTAAAAAGGT  
 AACCTGTACTAACGCTGAGCTGGTAAAAGGAAGACAGTACTTAAATATGGGTAAGAAGCCCTCCAGATAAAAATACAATTTTCAGTTTCAGGTACA  
 TCTACCCITTAGATTCTTGGCTGGATTTGAATACTGGCTTAGACACAACATGTTTCACTGTTCAAGCATTTTGTAGCTAAATTTAGATGAATTT  
 GCCGAAGATATCTTTTAAATGGATGCTAAAATTCCTGAAATTCAGCTGCATACAGATTTGCACTTATGGACTCCTGTGTTGAAAGTTCTTTTTT  
 TGTCTTCTTTTTTTTAAACATTCATAGCTGGTCTTATTTGTAAGCTCAGTTTACTTAGAATTAGTGGCACTTGGCTTTTATTAGAGAATGATT  
 TCAAATGCTGTAACCTTCTGAAATAACATGGCCCTGGAGGGCATGAAGACAGATCTCCCAAGGTTATGGACACCGGAAACAAATAAATGGAA  
 ACACCTCCTCAAACCTACCCTCAGGAATGTTTGTGGGGCCGAAAGAACAGTCCATTGAAAGGGAGTATTACAAAACATGGCCCTTGGCTTGA  
 AGAAAATACCAAGGAACAGGAACTGATCAATTAAGCCTGAGTTTGTCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO:2

>gi | 297270262 | эталонная последовательность | XM\_001095750.2 | ПРЕДСКАЗАННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: компонент 5

системы комплемента *Moraxella mullata* (C5), мРНК

CATGATTTCCIGCTACCTCCAACCATGGGCTTTTGGGAAIACIIIGTTTTAAICTCCIGGGAAAAACTIGGGGACAGGAGCAAAACAIAIGICAIIG  
 TCAGACCACAAAATATCCCGTGTGGAGCATCTGAAAACATTTGTATCAAGTTTATGGATACACTGAAGCATTGATGCAACAATCTCTATTAAGA  
 TTATCCTGATAAAAAATTTAGTTACTCTCAGGCCATGTTTCATTTATCCTCAGAGAATAAATCCAAAACCTGGCAGTCTTAAACAATAACAACCAAAACA  
 ATTACTGGAGGACAAAACCAAGTTTCTTATGTGATTTGGAAGTTGTATCAAAGCATTTTTCAAATCAAAAAAATTCACAACTATGACAATG  
 GATTTCTCTTATTATACAGACAACCTGTTTATCTCCAGACCAATCAGTAAAGGTTAGAGTTTATCCGTGATGACTTGAAGCCAGCCAAAA  
 GAGAACTGTCTAACTTTATAGATCTCTGAAGGATCAGAAATGACATGGTAGAAGAAATGATCATATTGGAAATATCTCTTTCTGACTTCAAG  
 ATCCGTCTAATCCTAGATATGTTATGGATGATCCAGGCTAAATAAAGAGGACTTTTCAACAACCTGGAAGTCAATTTTGAAGTAAAGAATA  
 TGTCTTGCCACATTTTTCTGTCTCAGTAGAACCAAGAAATTAATTCATTTGGTTATAAGAACTTTAAGAATTTTGAATTAATAAAAGCAAGATATTT  
 TTATAATAAAGTAGTCACTGAGGCTGATGTTTATATCACTTTGGAATAAGAGAAGACTTAAAAGATGATCAAAAAGAAATGATGCAAAACAGCAATG  
 CAAAACACAATGTTGATAAATGGAATTTGCTCAAGTCACATTTGATTCTGAAACAGCAGTCAAAGAACTGTCATACTACAGTTTAGAAGATTTAAACAA  
 CAAGTACCTTTATATTGCTGTAACAGTCATAGAGTCTACAGGTGGATTTTCTGAAGAGGCAGAAATACCTGGCATCAAATATGCTCTCTCCCTACA  
 AACTGAATTTGGTTGCTACTCTCTTTCTGAAAGCCTGGGATTCATATCCATCAAGGTGCAGGTTAAAGATGCGCTTGACCAGTTGGTAGGAGGG  
 GTCCAGTAAACACTGAATGCAACAACAATGATGTCAACCAAGAGACATCTGACTTGGAGCCAAGGAAAAGTGAACACGTGTTGATGATGGAGTA  
 GCTTCGTTTGTGGTTAATCTCCATCTGGAGTGACGGTCTGGAGTTAATGTCAAACCTGATGCTCCAGATCTCCAGACGAAAATCAGGCCAGGG  
 AAGGTTACCGAGCAATAGCATACTCATCTCTCAGCCAAAGTACCTTTATATCGATTGGACTGATAACCAACAAGGCTTGTAGTGGGAGAATATTTG  
 AATATTATTGTTACCCCAAAAGCCCATATATTGACAAAATAACTCACTATAAATCTTGATTTTATCCAAAGGCAAAAATATCCACTTTGGCACAAGG  
 GAGAACTTTCAGATGCATCTTCAAAGTATAAACATTCAGTAAAGCAGAACATGTTTCTTCAATCCCGACTCTGGTCTATTCATCTGTCACAGG  
 AGAGCAGACAGCAGAATTAAGTGTCTGATTGAGTCTGGTTAAATTAAGAAAATGTTGGCAACCAAGCTCCAGGTTTCACTGTCTCCTGTATGCAAGT  
 ACATATTCTCCAGGCCAACTGTGTCTTAAATGTTAACTGGATGGATTCTGGGTGGCATTAAACAGCAGTGACAGCGCTGTGTATGGAGTCC  
 AAAGAAGAGCCAAAAGCCCTTGGAAAGAGTATTTCAATCTTAGAGAAGAGTATCTGGGCTGTGGGGCAGGTGGTGGCCTCAACAATGCCAATG  
 TGTTCACCTAGCTGGACTTACCTTCTCACTAATGCAATGCAGATGACTCCCAAGAAAATGATGAACCTTGTAAAGAAAATATCAGGCCAAGAGA  
 ATGCTACAAGAGAAGTAGAAGAAATAGCTGCTAAATATAAACATTTAGTAGTGAAGAAATGTTGTTACGATGGAGTCCGTATTAATCATGATGAA  
 ACTGTGAGCAGCGAGCTGCACGGATTAGTGTAGGGCCGAGATGCTCAAAGCTTTCAGTAAATGTTGTGCTCGCAAGCCAGCTCCGTGCTAATA  
 ACTCTCATAAAGACTTGAATTGGGAAAGGCTACACATGAAGACCTGTTACCAAGTAAAGCAAGCCAGAAAATTCGGAGTTAATTTCCAGAAAAGCTGGTT  
 ATGGGAAGTTCATCTTGTCCAGAAAGAAAACAGTTGCAGTTTGCCTACCTGATTCTGTAACCTCCGGAAATCAAGGTGTTGGCATTCAAACA  
 GTGGTATATGTTGCTGATCTAATAAGGCAAAAGGTTTCAAAGATGCTTCTCCTGAAAATGAATATACCATATCTGTTGTACGAGGAGAACAGGT  
 CCAGTTGAAAGGAACTGTTTACAACATAGGACTTCTGGGATGCAAGTTCTGTGTTAAAATGCTGCTGTGGAGGGAATCTGCACCTTCAAGAAAGCCCA  
 GTCATTGATCATCAGGGCACAAAGTCTCCAAATGTGTGCGACAGAAAGTAGAGGGCTCTTAATCACTTGGTACCTTTACTGTGCTTCTCTGGGA  
 AATTGGCTTCAAGAACATCAATTTCTCACTGGAGACTTCTGTTGGAAAAGAAATCTTAGTAAAATCGTTACGAGTGGTCCAGAAAGGTGCAAAAAGG  
 GAAAGCTATTCTGGTATTACTTTGGATCCTAGGGGATTTATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAAAGGAGTCCCATACAGGATACCATAGA  
 TTTGGTCCCAAAACAGAAAATCAAAGGATTTGAGTGTAAAAGGACTGCTTGTAGGTGAGATCTTGTCTGCAGTCTAAGTCCGGAAGGCATCAAT  
 ATCCTAACCCACCTCCCAAGGGAGTGCAGAGGGCGAGCTGATGAGCGTTGCCAGTATTTCTATGTTTTCACTACTCTGAAAACAGGAAATCAIT  
 GGAACATTTTTCATCCGACCCATTAATGAAAAGCGGAACCTGGAGAAAATTAAGAAGGAGTGGTGGAGCATTATGCTCTACAGAAATGCTG  
 CTGAACTTGAAGACATAAATATGTTAACCCCAATCATCAATGGCTATCAGAAGAGCAGAGGTTATGGAGTGGCTTTTATTCACCCAGGACACAA  
 GAACCAAAAATCAATATGTAATTTTATTGTGGCTGGTTGAGAATTATCAGTTAGATAATGGATCCTTCAAGGAAAATTCACAGTATCAACCAATAA  
 AATTACAGAAAATCAACACAGCTCTAATTAAGCTGACACCTTCTGCTGAAAATACACTGCCAGCCAGAGCACCTTTACATTGGCCATTTCTGCCT  
 ATGCTCTTTCCCTGGGAGATAAAACTCACCCACAGTTTGTTCATTTGTTTCAAGTGTGAGAGGAAAGCTTTGGTTAAAGGTAATCCACCCATTTATC  
 GTTTTTGGAAGACAGTCTTCAACATAAAGACAGCTCTGTACTCAACTGGTACAGCAGTATGGTAGAAAACAACCTGCCTATGCTTTACTCACCAGT  
 CTGAACTTGAAGACATAAATATGTTAACCCCAATCATCAATGGCTATCAGAAGAGCAGAGGTTATGGAGTGGCTTTTATTCACCCAGGACACAA  
 TCAATGCCATCGAGGGCTGACAGAATTTCACTCTGGTTAAACAGCTCCGCTGAATATGGACATCGATGTTGCTTACAAGCATAAAGGTCCTTA  
 CATAATTATAAAATGACAGACAAGAATTTCTTGGGAGGCCAGTAGAGGTTCTTCAATGATGACCTCGTTGTGAGTACAGGATTTGGCAGTGGCT  
 TGGCTACGGTACATGTAACAACCTGTAGTTCAAAAACCAAGTACCTCTGAGGAAAGTTGCAGCTTTTATTTGAAAATGATACTCAGGATATTGAAGCA  
 TCCCACTACAGAGGCTACGGAACTCTGATTACAAAACGCATAGTAGCATGTGCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAAGAATCATCTTCTGGATCCTCTC  
 ATGCAAGTATGGACATCTCCTTGCCTACTGGAATCAATGCAAAATGAAGAAGACTTAAAAGCTTGTGGAAGGGGTGGATCAGTATTCACTGATTA  
 CCAAATAAAGATGGACATGTTATTTCTGCAACTGAATTCGATCCCTCCAGTGATTTCCCTTGTGTAACGATTCGGATTTTGAAGTGG  
 GTTCTTAGTCTGCCACTTTCACAGTGTATGAATACCACAGACCAGATAAACAGTGTACCATGTTTATAGCACTTCCAATATCAAATTCAGAAAGT  
 CTGTGAAGGAGCCAGCTGCAAGTGTATAGAAGCTGATTGTGGGCAATGCAGAAAAGAAATGGATCTGACAATCTCTGCAGAGACTAGAAAACAAC  
 AGCATGTAACCCAGAGATTGCATATGCTTAAAGTTATCATCACATCCATCACTACAGAAAATGTTTTGTCAAGTACAAGGCAACCTTCTGGATAT  
 CTACAAAACCTGGGAAAGCTGTTGCTGAAAAGACTCTGAAATCACTTCAATTAAAAAGGTAACCTGCACTAACGCTGAGCTGGTGAAGGGAAGACA  
 GTACTTAATTATGGGAAAGAAAGCTCTCCAGATAAAATCAATTTCACTTTCAGGTACATCTACCTTTAGATTCTTACCTGGATTGAATACTGGCC  
 TAGAGACACAACATGTTTATGCTGCAAGCAATTTTAGCTAATTTAGTAGAATTTGCTGAAGACATCTTTTTAAATGGATGCTAAAATTCCTGAAAGTTC  
 AGCTGCATACAGTTTGCATTTAGGACTCTGTTGTTGAAGTTGTTTTTTTTCTGTTTTTTGCTTTAAACATTCACAGCTGGTCTTATTGTAAG  
 CTCACTTTACTTAGAATTAGTGGCACTTCTTTTATTAGAGAATGATTTTAAACGCTGTAACCTTCTGAAATAACATGGCCTTGGAGGGCATGAAGAC  
 AGATACTCTCAAGGTTATTGGACACCCGGAACAATAAATTAGAACCCTCTCAAACCTACCCTTAGGAATGTTGCTGGAGCCGAAAGAACAG  
 TCCATTTGAAATGGAGTATTACAAAACATGGCCTTTGCTTGAAGAAAATACCAGGGGACAGGAAACTGATCAITAAAGCCTGAGTTTCTTCAAA  
 CTGTGCTAAAA

**Фигура 18B**

SEQ ID NO:3>g|291575171|эталонная последовательность | NM\_010406.2 | гемолитический комплемент Mus musculus (Hc),  
 MPMK TTTAAAGGAAAGTGGTTACAGGGAGGCCATGCCCATGGGTTTATGCCGCTACCAGCCATGGGTCCTTGGGGAATACTTGTCTTTAATTTT  
 CCTGGACAAAACCTGGGGACAGGAACAAACCTACGTCATTTTCAGCACCCAAATCCTCCGGGTCGGCTCGTCTGAAAATGTGGTAATTCAAGTCCAT  
 GGCTACACTGAAGCATTGATGCAACTCTTCTCTAAAAAGCTATCCTGACAAAAAAGTCACTTCTCTCAGGCTATGTTAATTTGCCCGGAAAAAC  
 AAATTCAAAAACGCGGCACTGTTGACACTACAGCCCAATCAAGTTCCTAGAGAAGAAAGCCAGCTCTCACGCTGATCTGGAAAGTTGTGCAAAAC  
 ACTTTTCAAAATCAAGAAAAATACCAATTACCAATTAACAATGGAATCTCTTATCCATACAGACAAACCTGTTTACACGCGGACCAGTCAAGTAAAG  
 ATCAGAGTCTATTCTCTGGGTGACGACTTGAAGCCAGCCAAACAGGACTGCTTAACTTTTATAGACCCCGAAAGATCAGAGTCTGAAATTTGAGAG  
 AAGAAAATGATTACACCGGAATATCTCTTTCTGACTCAAGATCCATCTAATCCCAAGTATGGTGTGGACAATTAAGCTAATATAAGAAAG  
 GATTTTACAACAACCTGGAAGTGCATCTTTGAAATTAAGAATATGCTTTGCCAGGATCTCTGTTTCAATAGAACTAGAAAAGAACCTTCATTGGCTAT  
 AAAAATTTAAGAATTTGAAATCACTGTGAAAGCAAGATATTTTATAATAAGTGGTACCTGATGCTGAAGTGTATGCCTTTTTGGATTGAGAGA  
 GGACATAAAAGATGAGGAGAAGCAGATGATGCACAAAAGCCACACAAGCCGCAAAAGTTGGTTGACGGAGTTGCTCAGATCTCTTTGATTCTGAAAG  
 AGCAGTAAAGAGCTGCTCAACAAGCTAGAAGACTTAAACAACAAGTACCTTTATATTGCAGTAAACAGTACAGAAATCTCAGGTGGATTTTCAG  
 AAGAGGCAGAAATCCCTGGAGTCAAAATATGCTCTCTCCCTACACACTGAAITTTGGTCCGCTACTCTCTTTTCTGGAAGCCCGGGATTCCATTTTCCA  
 TCAAGGCACAGSTTAAAGATCACTCGAGCAGGCGGTAGGAGGGGTCAGTAACTGATGGCACAACAGTCCGATGTGAATCAAGAGACATCTG  
 ACTCCGATTTCTCAGCAGCACTCTTGGTCTATTACATAGTCAAGGGGAGCAACACAGCAGAATTAGTGGCTGACGCTGGATCAAAATTTGAGGA  
 GAAGTGTGGCAACCAGCTCCAGTCCATCTGTCTCCAGATGAATATGTGATTCTCCAGGCCAAACTGTGCTCCCTGACATGCTGACTGAAGCAGACT  
 CATGGGTAGCACTATCAGCAGTGGACAGAGCTGTGTATAAAGTCCAGGGAAACGCCAAAAGGGCCATGCAAAGAGTCTTCAAAGCTTTGGATGAAA  
 AGAGTGACCTGGGCTGTGGGCGAGTGGTGGCCATGCAATGCAGATGATTCATCTAGCTGGGCTCACCTTCTCACCACGCAACACGAGATG  
 ACTCCGATTTCTCAGTACTCTTGTAAAGAAATTCAGGGTCAAGAGAAACCTGATCTCCTAAGGCAGAAAATAGAAACAAGCTGCTGAAAGT  
 CAAACATAGTGTGCCAAAGAAATGCTGCTATGACGGAGCCGAGTGAATCTACGAAACCTGTGAGGAGCGAGTGGCCCGGTTACCATAGGCC  
 TCTCTGCATCAGGGCCCTCAACGAGTGTCTACTATTGCGAAACAAGTCCGAAAAGAAAGCCCAATAAACCTGTCCAAGTGGAAAGGATCCACATT  
 AAGACCCCTGTTACCAGTGTGAAGGCAGATATCCGAAGCTACTTCCAGAGAGCTGGCTATGGGAAATTCATCCGCTTCCCAAGAAAACAGCTGC  
 ACTCAGCTGCCTGACTCACTCAACGACTTGGGAAATTCAGGCAATTCAGAGCAATGGTATATGTTGCTGATACCTCAAGGAACTTCAACTATATG  
 GTTCAAAGAAGTCTTCTGGAGATGAACATACCATATTCTGTTGTGCGAGGAGACAGATCCAATTAAGGGAAGTCTTCAACTATATGACTCA  
 GGACAAAAGTCTGTGTTAAAATGTCTGCTGTGGAGGGGATCTGCATTCAGGAAGCTCAGCTGCTAGCCTTACACCTCCAGGCCCTCCAGATGTG  
 TGTCCAGAGGATAGAGGGCTCGTCCAGTCACTTGGTGACCTTACCCTGCTTCTGGAATTTGGCTTCACTCCATAAAGTCTCACTAGAGACCT  
 CATTGGGAAAGACATCTTAGTAAAGACATTAAGGAGTGTGCTGAGTCCGAAAGGATCAAGAGGAAAGCTATGCCGCGTGTACTTGGACCTAAGGGA  
 ATTCGTTGATTTGTTAACAGACGAAAGGAATCCCATACAGGATCCCAATTAAGTTTGGTCCCAAGACCAAGTGAAGGATTTGAGTGTCAAAAG  
 GACTGCTGTAGGGAGTCTTGTCCACGGTCTGAGTAAGGAAGGCATCAACATCTAACCCACCTCCCAAGGGCAGTGCAGAGGCAGAGCTCAT  
 GAGCATAAGCTCCGGTGTCTATGTTTTCCACTACCTGGAAAGCAGGAAACCATTTGGAATATTTCTATCTCTGATACACTGAGTAAAGACAGAGCCTGG  
 AGAAAAAATAAAACAAGGGGTGGTGAAGCTCATGTCTACAGAAACGCTGACTTCTACAGCATGTGGAAAGGGGGCGAGCGCTAGTACCTGG  
 CTGACAGCTTTTGTCTGAGAGTGTGGACAGGTGGCCAAAGTATGTAACAGGAGTGAACAACTCAATTTGAACTCTTTGCTATGGCTGGTTGAGA  
 AGTGTCAAGTGGAAACGGCTCTTCAAAGAAAATTCACCAATATCTACCAATAAAATACAGGGTACTTTGCTGCTGAAGCCCAAGAGAAAACCTT  
 GTATCTTACAGCCTTTCTGTGATTGGAATAGAAAAGCAGTTGACATATGCCCCACCATGAAAATCCACAAGCGCTAGATAAAGCCGACTCCTTCC  
 TGCTTGAACACCCCTGCCATCCAAGAGCACCTTCACTGGCCATGTAGCCTATGCTCTTCCCTAGGAGACAGAACCCACCGAGGTTTCGCTCTA  
 ATTTGTGTCGGCCCTGAGGAAGGAAAGCTTTTGTAAAGGTGATCCGCTTATACCGTTACTGGAGAGATACCTCAACGCTCCAGACAGCTGTGGCC  
 CAGCAGCGGCACAGCAGGTATGGTTGAAACCACAGCCTATGCTTTGCTGCCAGCCTGAAACTGAAGGATATGAATACGCCAACCCCATCATCAAG  
 TGGCTATCTGAAGAGCAGAGGTATGGAGGCGGCTTTTATCCACCCAGGATACGATTAATGCCATCAGGGCCTGACAGAAATTAACCTCTCTGTTAA  
 AACAAATTCATTTGGATATGGACATCAATGTCGCCATAAACACGAAGGTGACTTCCACAAGTATAAGGTGACAGAGAAGCATTCTCTGGGGAGGCC  
 AGTGGAGGTATCTCAATGATGACCTTGTGTCAGCACAGGCTACAGCAGTGGCTTGGCCACAGTATATGTAACAACTGTTGTTACAAAATTAAGT  
 GTCTCTGAGGAATTTGACAGCTTTACTTGAATAATGATACCCAAAGATTTGAAGCATCCAGCCACTTCAAGGCTCAGTACTCTGGATTCAAGCGCAT  
 AATAGCATGTGCCAGTCAAGGCCAGCAAGGAGGAGTCAACATCCGGGCTCTCCATGCAATGATGATATCACTGCGACTGGAATCGGAGC  
 AAACGAGGAAGATTTACGGGCTCTTGTGGAAGGAGTGGATCAACTACTAAGTATACCAGATCAAAGATGGCCATGTCAATCTGCAACTGAAATTCG  
 ATCCCTCCAGAGATTTCTCTGTGTCCGGTCCGGATATTTGAACCTTTCCAAGTTGGGTTTGAATCTGCTACCTTCAAGGTGACAGATCACA  
 GACCAGATAAGCAGTGCACCATGATTTATAGCATTTCTGACACCAGGCTTCAAGAAAGTCTGTGAAGGAGCAGCTTGCACATGTGTGGAAGCTGACTG  
 TGGCAAACCTGAGGACAGAAATGACCTAGCCATCTCTGCAAGCTCCAGAAAAGAGAAAGCCTGTAACCCAGAGACTGCATATGCTTATAAAGTCAAG  
 GATCACAATGACCCACTGAAGAAAATGTTTTGTCAAGTACACTGCGACTCTTCTGGTCACTTACAAAACAGGGGAAGCTGCTGATGAGAATTCGGAG  
 GTCACTTCAAAAAGATGAGCTGTACCAATGCCAACCTGGTGAAGGGGAAGCAGTATTTAATCATGGGCAAGAGGTTCTGCAATCAAAAC  
 AATTTCAAGTTCAAGTATATACCTCTAGATTCTCCACCTGGATTGAATATTGGCCACAGACACAACGTGCTCATCTGTCAAGCATTGTAGAG  
 AATTTGAATAACTTTGCTGAAGACCTCTTTTAAACAGCTGTGAATGAAAAGTCTGCTGCACGAAGATTTCTCTGCGGGGGGGGATTGCTCTCC  
 TCTGCTTGGAAACCTAGCCTAGAAATCAGATACACTTTCTTAAAGTAAAGCACAAGCTGATGAGTTACGATTTGTGAAATGGATAGCCTTGGAGG  
 GAGGCGAAAACAGGTCGCCAAAGGCTATCAGATGTCAAGTCCAAATAGACTGAAACAAGTCTGTAAGATAGCAGTCAAGGGGTGTTGGTTGGGCGG  
 GAAGAAAGAGACCCACTGAAACTGTAGCCCTTATCAAAACATATCTTGTGTTGAAAAGAAAATACCAAGGACAGAAAATGCCATAAAATCTTACT  
 TGCACTC

Фигура 18С

SEQ ID NO:4 >gi | 392346248 | эталонная последовательность | XM\_345342.4 | ПРЕДСКАЗАННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ:

компонент 5 системы комплемента *Rattus norvegicus* (C5).

мРНК ATGGATAGCACAGAGACCGACAGATGTCTACAGCCGCCCATCATCTTTCCGGAACATTAACTCAGTGCTTGCTGCCCTGTAGGTGGGTTT  
 TCGGAAGAGGCGAGAAATTCCTGGCATCAAATACGTCCTCTCTCCCTATACACTGAATTTGGTCGCTACCCCTCTTTCTGAAGCCTGGGATTCCATTT  
 TCCATCAAGGTACAGGTTAAGGATTCACTCGAGCAGTTGGTAGGAGGGTCCCAGTAACTCTGATGGCACAAACAGTCAATGTGAATCAAGAGACA  
 TCTGACTTGGAAACAAAGAGGAGCATCACACACTCTGCTGATG GAGTGGCTTCATTTGGTGAACCTCCCATCAGAAGTGACATCACTGAAAGTTTG  
 AGGTCAAACATGATGCCCGGAACCTCCCGAAGAAAATCAAGCCAGCAAAGAAATGAAGCAGTTACATACTCATCCCTCAGCCAGAGTTACATTTA  
 CATTGGCTGGCAAACTACAAGCCATGCTTGTGGGAGAATATCTGAATATTATCGTCACCCCAAGAGTCCATATATTGACAAAATAACTCACT  
 ATAATTACTTGATTTTATCCAAAGGCAAAATTTACAGTATGGCACAAAGGAGAAACTTCTCTATTTCATCTTATCAAATATAAACATGCCAGTGACAC  
 AGGACATGGTTCCTCAGCGCGCTCCTGGTCTATTACATAGTCACGGGGGAGCAGACAGCAGAAATTGGTGGCTGACGCAGTCTGGATAAACATTG  
 AGGAGAAGTGTGGCAACCAGCTCCAGTCCATCTGTCTCCAGATAAAGACGTGTATTCTCCAGGCCAAACTGTGTCCCTTGACATGGTGAAGTGAAGC  
 AGACTCATGGGTGGCACTATCTGCGGTGGACAGCGCTGTGTATGGAGTCCGGGGAAAAGCCAAAGGGCCATGCAAAGAGTGTCCAAGCTTTTGA  
 TGACAAGAGTGACCTGGGCTGTGGGGCAGGTGGTGGCCGTGACAATGTAGATGTATTCCATCTAGCTGGGCTCACCTTCTCACC AATGCAAACGCA  
 GATGACTCCCAATACCAGGATGACTCTTGAAGGAAATTCAGGCCAAAGAGAGACCTGCAGCTCCTGCATCAGAAAGTGGAAAGAACAGCTGCT  
 AAATACAAACACCGTGTGCCCAAGAAATGCTGTATGATGGAGCCGAGAAAACAAATACGAAACCTGTGAGCAGCGAGTTGCCCGGGTGACCATA  
 GGCCCACTGCATCAGGGCCTTCAAAGAGTGTGTACTATTGCGGATAAGATCCGAAAAGAAAAGCCACCACAAAGGCATGTCTTGGGAAGGATC  
 CAAATAAAGGCCCTGTACCAGTGATGAAGGCAGAAATCCGAAGCTACTTTCCAGAGAGCTGGCTATGGGAAGTTCATCGTGTCCCAAAGAAACC  
 AGCTGCAGTTGCACTGCCTGACTCACTGACGACCTGGGAAATCAAGGCATCGGCATCTCAGACAATGGTATATGTGTGCTGACACACTCAAGGC  
 AAAGGTGTTCAAAGATGTCTTCTGGAGATGAACATACCATATTCTGTTGTACGAGGGAGCAGATCCAAATGAAGGGAAACCGTTTACAATTATAGG  
 ACCTCTGGGACAAATGTTCTGTGTTAAATGTCTGCCGTGGAGGGAAATCTGCACTCCAGGAAGCTCGGCTGCTAGCCCTCAGACCTCTAGGTCTCCAG  
 ATGTGTGGCCAGAGAATAGAGGGCTCCTCCAGTCACTTGGTGAACCTCAGCCTGCTTCTCTGGAATTTGGCCTTCACTCCATAAACTTCTCACTAGA  
 GACTTCATTTGGGAAAGAAATCTTAGTGAAGACATTACGGGTAGTGCCAGAAGGGATCAAAGGGAAAGCTATGCTGGTGTGACTCTGGACCCAG  
 GGGAGTTTATGGTATTGTTAACAGACGAAAGGAATCCCATACAGGATACCATTAGATTTGGTCCCAAACCAACGTCAAAAGGATTTTGTAGTGA  
 AAAGGACTGCTTATAGGGGAATCTTGTCCACGGTCTGAGTAAAGAAGGCATCGACATCCTAACCCACCTCCCAAAGGGCAGCGCGAGGCAGAA  
 CTCATGAGCATAGTCCCGGTGTTCTACGTTTTCCACTACCTGGAAGCAGGAAACCATTTGGAATATTTCCACCTGATACGTTAGCTAGAAAACAGAG  
 CCTGCAGAAAAAATAAAAGAAGGGCTGGTGAAGCCTCATGTCTACAGAAACGCTGACTATTCTACAGCATGTGGAAGGGAGCAAGCTCTAGTGC  
 CTGGCTGACAGCTTTTGTCTGAGAGTGTGGACAGGTGAACAAGTATGTGAACAAGACCAATACTCGATCTGTAACCTCTTGTATG GCTGATTG  
 AGAAGTGTGAGCTGGAACCGGATCTTCAAGGAAATTTCCCAATATCTACCAATAAAATTACAGGGTACTTTGCTGTGTAAGCCCAAGAGAAACAC  
 TTTATATCTTACAGCCTTTCTGTGATTGGAATTAGAAAGGCTATTGGCATATGCCCCACGGAGAAAATCTACACAGCGCTGGCTAAAGCTGACTCCT  
 TCTACTTGAAGGACCTGCCTTCCAAGAGCACTTACCCTGGCCATTGTGGCTATGCTCTCTCCCTGGGAGACAGAACCCACCAGGATTTGCTT  
 CTATTGTGTACGCCCTGAAGAGGGAAAGCTTTGGTTAAAGGAGACCCGCCATTTACCGTTTCTGGAGAGACACTTCCAACGTCAGACAGCTCAGC  
 ACCCAACAGCGGACAGCAGGTATGGTAGAAACCAGGCCTATGCTTTGCTCACCAGCCTGAACCTGAAGGAGACGAGTTATGTCAACCCGATCATC  
 AAGTGGCTATCTGAGGAGCAGAGGTATGGAGGCGGCTTTTATCCACCCAGGATACCAATTAACGCCATCGAGGGCCTGACAGAGTATCACTCCTGG  
 TTAACAACACTTCAATTTGGATATGGATATCAATGTCTCTACAACAACAAGGGGATTTCTACCAGTATAAAGTGACAGAGAAGAATCTCCTCGGGAG  
 GCCAGTGGAGGTACCCCTCAATGATGACCTCATCGTCAACAGGCTATAGCAGTGGCTTGGTACAGTATATGTA AAAACTGTGTTTCAAAAAC  
 AGTGTGCTGAGGAATTTTGTGAGCTTTTACTTGAAAATTTGATACCAAGAAAGTTGAAGCCTCCAGCTACCTCAGTACAGTGAAGTCTGCGGACACAAGC  
 GCATAATAGCCTGTGCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAGGAGTCAAGCATCTGGGTCTCCCATGCAGTAAATGGATATACTGCTGCCGACCGGAATCG  
 GAGCAAAACCAAGAAGATTTACGAGCTCTTGTGGAAAGGAGTAGATCAACTCTAAGTATTACCAGATCAAAGACAGTCAATGTTATTCTGCAATTGAA  
 TTCGATTCCTCCAGAGATTTCTTTGTTCGGTCCGGATATTTGAACTTTTCCAAGTTGGGTTTCTGAATCTGCTACGTTACAGGTGTACGAGTAT  
 CACAGACCAGATAAGCAAGTACCATGATTTACAGCACTTCTGACACCAACCTTACAGAGTCTGTGAAGGAGCGGCATGCAAATGCGTTGAAGCTG  
 ATTGTGGGCAACTGCAGGCAGAATGGACCTGGCCATCTCTGCAGACACCAGGAAAGAAACAGCATGTAACCCAGAGATTGCATATGCTTATAAGG  
 TCAGGATCAGCTCGCCACGGAAGAAACATTTTTGTCAAGTACACTCGACGCTTCTGGATATTTACAAAACAGGGGAGCGCTGAGAGAGG  
 ACTCTGAGATCACCTTCATTA AAAAGATAAGCTGTACCAACGCCAACCTGTGAAAGGAAAGCAATATTTAATCATGGGCAAGAGGCTCTGCAGAT  
 CAAAACAAATTCAGTTTCAAGTATATATACCTCTAGATTCTCCACCTGGATTGAATATTGGCCACAGACACAACGTGTCCATCTGCCAAGCGTT  
 TGTAGCTAATTTGGACGAGTTCGCTGAAGACATCTTTCTAAATGGCTGTGAAAATGCCTGAGGAAAGTCTGCTGCGTGGCCTTCCCGGTACTCCTGT  
 TGGTGGCTCTAGGAGCCAGGATCGCTTGGAAACTTAGCCTAGAATCGGATACATTTTCTTATAGTAAAGCGTAAGTTGAAGAGTACTTTGTGAA  
 ACAAATAGCCTTGTGGAGAGCCGAAGGCAGGTCCCCAAGGCTATTGGACATCAGCACCAATAAGCTGGAACAAGTCTGTAACGTTAGCAGCCAG  
 GGGTGTGTTGGGGCCGGAAGAGAGACTCACTGAAATGTAGCCCTTAGGAAAACATGGTCTTGCTTGA AAAAAAAAAAATACCAAGGACAGAAA  
 ATGCCATAAAAGCTTGACTTTGCACTCAACTGTA

**Фигура 18D**

SEQ ID NO:5 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:1

```

TTTTTTTTTTTTTTTGAAGGCAAACTCAGGCTTAATGATCAGTTTTCTGTTCTTGGTATTTTTCTTCAAGLAAAGGCAATGTTTTGTAATACTCCC
TTTCAATGGACTGTTCTTTCCGCCCAACCAACCACTTCTGAGTGGTAGGTTTGAGGAGGTGTTCCAATTTATTGTTCCGGGTGCCAATAACCTTGGAG
GAGTATCTGCTTTCATGCCCTCCAAGGCCATGTTATTTTCAGAAAAGTTCACAGCATTGAAATCATTCTCTAATAAAAAGCAAGTGCCACTAATTTCTAAGTA
AAGTGAGCTTTACAAAATAGACCAGCTATGAATGTTTAAAAAAGAGAAAACAAAAACGAACCTTCAACAACAGGAGTCCATAAGTGCAAACTG
TATGCAGCTGAACTTCAGGAATTTTAGCATCCATTTAAAAAGATATCTTGGCAAAATTCATCTAAATAGCTAAAATGCTTGACACGATGAACATGT
TGTGTCCTAGGCCAGTATTCATTCAGGTCAGGTCAGGAAATCTAAAAGGGTAGATGTACCTGAAACTGAAATTTATCTGAGGGGCTTTCTTACCCA
TAATTAAGTACTGTCTCTTTTACCAGCTCAGCGTTAGTACAGGTTACCTTTTTAATGAAGGTAATCTCAGAGTCTTTCTCAGCAACAGCTTCCCAGT
TTGTAGATATCCAGAAGGGTTGCCCTGTACTTGACAAAACATTTCTACAGTGTATGGATGTATGCTAACTTTATAAGCATATGCAATCTCTGGTTT
ACATGCTGTTGTTTTCTGCTCTGACAGATGTGCAGATCCAAATCTTCTGCAATTTGCCCAACATCAGCTTCTACACACTTGACACGGGCTCTTCA
CAGACTTTCTGAAATTTTGATATTTGAAAGTGCATATAAAACATGGTACACTGTTTATCTGGTCTGTGGTATTCGTACACTGTGAAAGTGGCAGGACTGAG
AAACCAACTTCAAAGATTCAAAATATCCGGAATCGTACACAAAGGAAATCACTGAGGGAAATCGAATTCAGTTGCAGAAATACATGTCCATCTTTG
ATTTGGTAATCAGTGAATAGTTTATCCACCTTCCACAAGGGCTTTTAAAGTCTTCTTCAATTTGCACTGATTCAGTAGGGCAAGGAGATGTCCATCACC
GCATGAGAGGATCCAGATGATGATTTCCCTGCTGGGCTGTAGCTGGCACATGCTACTATGCGTTTGAATCAGAGTTCCTGAGCTCTGTAGTG
GGATGCTTCAATATCTCGAGTATCGATTTTCAAATAAAAGCTGCAAACTTCTCAGAGGTAAGTGTGTTTGTGAACTACAGTTGTACATGTACTGTAGC
CAAGCCACTGCCAAATCTGTACTGACAAATGAGGTCACTTGAAGAAGCCTTACTGGCTCCCAAGGAAATCTTGTCTGTCAATTTATAATTATG
TAGGGCAGCTTTATGCTTGAAGAAACATCGATGCTCACTCAAGCGGAGTGTGTTAACAGGAGTGAATATTCCTCAGGCCCTCAATGGCATTGA
TTGTGCTGGGTTGAATAAAAGCCACTCCATACCTGTCTCTGTATAGCCATTTGATGACTGGGTTAACATAATTTATATCTTCAAAGTTCAGACT
GGTGAGTAAAGCAATAGGCAAGTGTCTTACCATACGTGCCCTACCAGTGTGAGTACAGAGCTGTCTTATGCTGAAGATGTCTTCCAAAACAGAT
AAATGGGTGGATTACCTTTAACCAAAGCTTCTCTTCAAAGCTGAAACAAATGAAACGAAACTGTGGGTGAGTTTTATCTCCAGGGAAGAGCATA
CGCAGAAATGGCCAATGTAAGGTGCTCTGGGCTGGCAGTGTATTTCAAGCAGAAAGTTCAGCTTTAATAGAGCTGTGCGATTTTACCAGG
GGCATATGATCGAAAGCCTTCTAATCCAAATCAGATAAGGCTCAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
TATTTGGTGTACTGTGAATTTCTTGAAGATCCATTAATGATAAATCTCAACTAGCCACAATAAAGAATTACAAAATGAATTTGGTCTGC
TCTAGTATTTATTTACTTGTCCAAGTACTTAAAGCAAAAGCTGTTAACCAAGTGTCAAGCACTTCCACCTTCCACACACTGTAAAGAGTAGTCAGCA
TTCTGTAGGACATAATGCTCAACATCCCTTTTAAATTTTTCTTCAGTTTCTGCTTCAATTAATGGGTGAGAAATGTTCCAATGATTTCC
TGTTCCAGGTGAGAAACCATAGAATACTGGGCAACGCTCAGTCCGCTCTGCACTCCCTTGGGGAGGTGGGTTAGGATATTTGATGCTT
TCTGACTTGAAGTGCAGACAGATCTCACCTACAAGCAGTCTTTTCACTCAAATCTTTTGTATTTGTTTTGGGACCAATCTAAGGGTATC
CTGTATGGGAATCTTCTGCTGCTAATGGTACCATAAATACCCCTAGGATCCAAAGTAAACACCAGAAATAGCTTTCCCTTTGACACCTTCTGGCACC
ACTCGTAATGTTTTACTAAGATTTCTTTCCAAACCAAGTCTCCAGTGAAGAAATGATGTTGTGAAGGCCAATTTCCAGAGGGAAGCACAGTGAATGT
CACCAGTGAAGTGGAGGAGCCCTTACTTTCTGGCGCACACATTTGGAGACTTTGTGCCCTGATGATCAATGACTGGGCTTCCGAAATGCAAGATTC
CCTCCACAGCAGACATTTAACACAGAAGTGCATCCCAAGAGTCTATAGTTGTAACAGTTCCTTTCAATTTGGATCTGTCTCTCTGTACAACAGAAAT
ATGGTATATTCATTTCCAGGAAAGCATCTTTGAACACCTTTGCCCTGACAGTATCAGCAACACATATACCAAGTGTGAAATGCCAACGCCCTTGAATTT
CCAGGTGGTTAGAGAAATCAGTAGGGCAACTGCAACTGTTTTCTTCTGGGAAACAAAGTGAATTTCCACACACCAGCTTTCTGSAAAATAACTCCG
AATTTCTGGCTTGTACTGGTAAACAGGGTCTCATGTGTAGCCTTCCAATTTGCATGTCTTTATGAGAGATATTAGCACGGAGCTGGCTTGGCAGCA
CACAACTTCAGTGAAGCTTTGATGCACTTGGCCCTAAACTAATCCCTGACAGCTCGCTGCTCAGAGTTCATCAATTTAACGCAGGCTCCATCGT
AACAACTTTCTTCACTACTGAATGTTATATTTAGCAGCTATTTCTTCTATCTTCTTTGACAGCTTCTCTTGGCCTGAGAATTTCTTACAAGGTTCA
TCAATTTCTTGGGAGTCACTGCAATTTGCAATTAGTGAGGAAAGTAAAGTCCAGCTAGGTGGAACACATTTGGCATTGTGAGGCCACCACCTGCCCAACA
GCCAGATCACTCTTCTAAGAATTGAAATCTTTCCAAAGGGCTTTTTGGCTCTCTTTGGACTCCATACACAGCACTGTCCACTGCTGCTAATGCC
ACCCAGGAATCCATTCAGTGGCATATTAAGAGACACAGTTTGGCCTGGAGAATATGCACTGCACTCAGGAGACAGATGAACCTGGAGCTGGTGC
CACATTTTCTTCAATATTTAACAGACTGAATCAGACACTAATCTGCTGTCTGTTCTCTGTGACGATGTAATAGACCAGAAGTGGGATGAAGGA
ACCAATGCTGTGTTACTGGAATGTTTATACTTTGATAAGATGCATGTGAAATTTCTCCCTCGTCCAAAGTGGATAATTTTGGCTTGGATAAAATC
AAGTAATATAGTGAGTATTTTGTCAATATATGGGCTTTGGGGTAAACAAATATTCAGATGTTCTCCCACTAGCAAAGCCTTATGGTTATCAGTC
CAATCAATATAAAGGTAACCTTTGGCTGAGAGATGAGTATGCTATTTGCTGGTAAACCTTCCCTGGCCTGATTTTCTTGGAAAGATCTGGAGCATCAGT
GGGATATGAAATCCAGGCTTCAAGAAAAGAGGAGTAGCAACCAATTCAGTTGTAGGGAGAGAGGACATATTTGATGCCAGGATTTCTGCTCTC
TTCAGAAAATCCACCTGTAGACTCTATGACTGTACAGCAATATAAAGGTAAGTGTGTTTAAATCTTCAAACCTGTAGTATGACAGTCTTTGACTGC
TGTTCAGAAATCAAATGTGACTTGAGCAATCCATTTATCAACATTTGTGTTTTGCATTTGCTGTTTGCATCATTTCTTTTTGATCATCTTTAAGTCTTCTC
TTATCCAAATGTGATATAAACGTCAGCCTCAGTGAATCTTTATATAAAATATCTTGTCTTTATAGTAATTTCAAATTTCTAAAGTCTTGTAAACC
AATGAAATATATCTGGCTCGATTGAGACAGAAAATGTGGCAAGACATATCTTAACTTCAAATAATGCGGTTCCAGTGTGTTGAAAGTCTCTCTT
TATATTTAGCTTGTGCTCACAATACATATCAGGATAGGAGGAAATCTTGAAGTCAAGGAAAGATAATTTCAAATATGATCAATTTCTTCAACA
TGTCAACTTCTGATCCTTCAAGGATCTATGAAAGTTAAGACAGTTTCTTTTTGGCTGGCTCAAAGTGTGCAATCAACGAAATAACTCTAATTTACTGA
CTGGTCTGGAGTATAAACAGGTTTGTCTGTATGAATGAAGAGAAATCCATTTGCATAGGTTAATGGCAATCTTTTGTATTTGAAAAATGCTTTGATAC
AACTTCAAATACACATAAAGAACTGGGTTTTGCTCCAGGCAATTTGTTTGGTGTATTTGTAAGATTGCAGAGTTTGGAAATTTATTTCTGAGGA
TAAATGAACATGGCTGAGGAGTAACTAAATTTTATCAGGATAACTTTAATAGAGATGTTGCACTCAAATGCTTCAAGTATCCATAAACTTGA
TCAATAATTTTCAAGTCTCAAACAGGAAATTTTTGGTGTGAAATGACATATGTTGCTCTGTCCCAAGTGTTCACCAAGGAAATTAATAAAC
AAAGTATTTCCAAAAGGCCCATGGTTGGAGTAGCAGGAAACACGGATATA

```

Фигура 18Е

SEQ ID NO:6 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:2

TTTTAGCACAGTTTGAAGCAAACCTCAGGCTTTAATGATCAGTTTCTGTCGCCCTGGTATTTTCTTCAAGCAAAGGCCATGTTTTGTAACTCCAT  
 TTCAATGBACTGTTCTTTCGGCTCCAGCAAACATTCCTAAGTGGTAGGTTTGGAGGTTTCTAATTTATGTTCGGGTGTCCTCAATACCTTGGAGG  
 AGTATCTGTCTTCATGCCCTCCAAGGCCATGTTATTCAGAAAGTTACAGCGTTTAAATCAATCTCTAATAAAAGCAAGTCCCACTAATTTAAGTAA  
 AGTGAGCTTTACAAATAAGACCAGCTGTGAATGTTTAAAGACAAAAAACGAGAAAAAAACAACTTCAACAACAGGAGTCCATAAGTGCAAAAC  
 TGATGACAGCTGAACCTCAGGAATTTAGCATCCATTTAAAAAGATGCTTCAGCAAATTCATCTAAATTAGCTAAAAATGCTTGACACGATGAACAT  
 GTTGTGTCTTAGGCCAGTATTCATCCAGGTCAGGAAATCTAAAGGGTAGATGTACCTGAAAGTGAAATTTGATTTTATCTGGAGAGCTTCTTCCC  
 CATAATTAAGTACTGTCTTCCCTTCCAGCTCAGCGTTAGTGCAGGTTACCTTTTTAATGAAGGTGATTTTCAGAGTCTTTTTCAGCAACAGCTTCCCCA  
 GTTTTGTAGATATCCAGAAGGGTTGCCTTGTACTTGACAAAAACAATTTCTGTAGTGTGGATGTGATGATAAATTTAAGCATATGCAATCTCTGG  
 GTTACATGCTGTTTGTCTTAGTCTCTGCAGAGATTGTCAGATCCAATTTCTTCTGCATTTGCCACAATCAGCTTCTATACACTGCACGTGGCTCCTT  
 CACAGACTTCTGAAATTTGATATTGGAAGTGCTATAAAACATGGTACACTGTTTATCTGGTCTGTGGTATTATACACTGTGAAAGTGGCAGGACTA  
 AGAAACCCAACTTCAAAGAGTTCAAATAATCCGGAATCGTACACAAGGAAATCACTGGAGGGGATCGAATTCAGTTGCAGAAATACATGTCATCTT  
 TTATTTGGTAATCAGTGAATAGCTGATCCACCCCTTCCAAGAGCTTTAAGTCTTCTCAATTTGCATTGATCCAGTAGGCAAGGAGATGTCATCA  
 ACTGGTGAGTAAAGCATAGGCAGTTGTTTCTACCATACGTGCTGTACCAAGTGTAGGTACAGAGCTGTCTTTATGTTGAAGACTGTCTTCCAATAAC  
 TGGGATGCTTCAATATCTGAGTATCAATTTCAAATAAAAGCTGCAAACTTCTCAGAGGTAAGTGTGTTTGTGAAGTACAGTTGTTACATGTACCGTA  
 GCCAAGCCACTGCCAAATCTGTACTGACAACGAGGTCATCATTGAGAAGCACCTCACTGGCTTCCAAGGAAATCTTGTCTGTCAATTTATAATTA  
 TGTAAAGGGACCTTTATGCTTGAAGCAACATCGATGTCATATTCAAGCGGAGCTGTTTAAACAGGAGTGAATATTCTGTCCAGGCCCTCGATGGCATT  
 GATTGTCTCGGGTGAATAAAAGCCACCTCCATACCTCTGCTCTTCTGATAGCCATTTGATGATTGGGTTAACATAATTTATGTCTTCAAGTTTCAG  
 ACTGGTGAGTAAAGCATAGGCAGTTGTTTCTACCATACGTGCTGTACCAAGTGTAGGTACAGAGCTGTCTTTATGTTGAAGACTGTCTTCCAATAAC  
 GATAAATGGGTGGATTACCTTAAACCAAGCTTCTCTTCAAAGCTGAAACAATTGAACAAAACCTGTGGGTGAGTTTATCTCCAGGGGAAAGAGC  
 ATAGGCAGAAATGGCCAATGTAAGAGTGTCTGGGCTGGCAGTGTATTTCAAGCAGAAAGGTGCAGCTTTAATAGAGCTGTGTGATTCTGT  
 AATTTTATGTTGATCTGTGAATTTTCTTGAAGGATCCATTTCTAACTGATAATTTCAACAGCCACAATAAAGAATTACATATTGAATTTGGT  
 TCTGCTACATATTTATGACTGTCCAAGTACTTAAAGCAAAAGCTGTTAACCAAGTGTAGCACTGCCACCTTCCACACGCTGTAAGAATAGT  
 CAGCAATTTCTGTAGGACATAATGCTCACCATCCCTTCTTTAATTTTCTCCAGGTTCCGCTTTCAATTAATGGGTGGAAATGAAAAATGTTCCAATG  
 ATTTCTGTTTCCAGGTAGTGAATAACATAGAACTACTGGGACAACGCTCACTCAGCTCCGCTCTGCACTCCCTTTGGGAGGTAGGATTTGAA  
 TGCTTCCCGACTTGAAGTGCAGACAAGATCTCACCTACAAGCAGTCTTTTACACTCAAAATCCTTTTGTATTCTGTGTTTGGGACCAAAATCTAATG  
 GTATCTGTATGGGAACTCTTTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAATAAATACCCCTAGGATCCAAAGTAAATACCAGAATAGCTTTCCCTTTTGA  
 CACCTTCTGGCACCCTCGTAACGATTTTACTAAGATTTCTTTTCCAACGAAAGTCTCCAGTGAGAAATGATGTTCTGAAGGCCAATTTCCAGAGGA  
 AGCACAGTAAAGTACCAAGTATTAGAGGAGCCCTCACTTTCTGTCCACACATTTGGAGGACTTTGTCCCTGATGATCAATGACTGGGCTTTC  
 TGAAGTGCAGATTTCCCTCCACAGCAGACATTTTAAACACAAGAACTGCAATCCCAAGAACTCTATAGTTGTAACAAGTTCCTTTCAACTGGACCTGTCTCC  
 TCGTACAACAGAATATGGTATATTCAATTTCCAGGAAGACATCTTGAACACCTTTGCCCTAATAGTATCAGCAACACATATACCCTGTTGAAATGCC  
 AACACCTTGAATTTCCAGGTAGTTACAGAATCAGGTAGGGCAAACTGCAACTGTTTCTTCTGGGAAACAAGATGAACCTCCATAACCAGCTTTCTG  
 GAAATAACTCCGAATTTCTGGCTTGTACTGTTAACAGGGTCTTCATGTGTAGCCCTTCCAATGCAAGTCTTTATGAGAGTTATTAGCACGGAGC  
 TGGCTTGGACGACACAACATTCAGTGAAGCTTTGACGCATCTCGCCCTACACTAATCCGTGCAGCTCCGCTGTACAGGTTTCTCATGATTAAT  
 ACGGACTCCATCGTAACAACATTTCTTCACTACTAAATGTTTATATTAGCAGCTATTTCTCTATCTTCTCTTGTAGCAATTTCTTGGCTGATAATTT  
 CTTACAAGGTTCAATTTCTTGGGAGTCACTGCAATTTGATTAGTGAGGAAGGTAAGTCCAGCTAGGTGGAACACATTTGGCATTGTTGAGGCCA  
 CCACCTGCCCCACAGCCAGATCACTCTTCTAAGAATTTGAAATACTCTTCCAAGGGCTTTTGGCTCTTCTTGGACTCCATACACAGCGCTGTCCA  
 CTGCTGTTAATGCCACCCAGGAATCCATCCAGTACCATAAAGAGACACAGTTTGGCTGGAGAAATATGATCTGCATCAGGAGACAGATGAAC  
 CTGGAGCTGGTGGCACAATTTCTTCAATTTAACCAGACTGAATCAGACACTAATTTCTGCTGTCTGCTCTCTGTGACGATGTAATAGACCAGGAG  
 TCGGGATGAAGGAACCATGTTCTGCGTTACTGGAATGTTTATACTTTGATAAGATGCATCTGAAAAGTTTCTCCCTTGTGCCAAAAGTGGATAATTTTGC  
 CCTTGGATAAAAATCAAGTAATTATAGTGAATTTTGTCAATATATGGGCTTTTGGGGTAAACAATAATTTCAATATTCTCCCACTAGCAAAGCCT  
 TGTGGTTATCAGTCCAAATCGATATAAAGGTAACCTTTGGCTGAGAGATGAGTATGCTATTGCTCGGTAACCTTCCCTGGCCTGATTTTCTGCTGGAAGA  
 TCTGGAGCATCAGTTTTGACATTAACCTCCAGCACCCGCTCACTCCAGATGGGAGATTAACCACAACGAAGCTACTCCATCATCAACACGTTGTTACT  
 TTTCTTGGCTCCAAGTCAAGTGTCTCTTGGTTGACATCAATTTTGTGCATTCAGTGTACTGGGACCCCTCTACCAACTGGTCAAGCGCATCTTTA  
 ACCTGCACCTTGATGGAATATGGAATCCAGGCTTCAGGAAAAGAGGAGTAGCAACCAAAATTCAGTTTGTAGGGAGAGAGGACATATTTGATGCCA  
 GGTATTTCTGCTCTTCAAGAAATCCACCTGTAGACTCTATGACTGTTACAGCAATATAAAGGTAATTTGTTTAAATCTTCTAACTGTAGTATGAC  
 AGTTCTTTGACTGTGTTTCAAGATCAAATGTGACTTGGCAATTCATTTATCAACATTTGTTTGGCATTGCTGTTGCATCAATTTCTTTTGTATCATC  
 TTTAAGTCTTCTTATTCCAAATGTGATATAAACAATCAGCCTCAGTGAATCTTTATATAAAAAATATCTTGTCTTTATAGTAATTTCAAATTTCTTAA  
 AGTTCTTATAACCAATGAAATTAATTTCTGGTTCTACTGAGACAGAAAAATGTGGCAAGACATATTCTTTAACTTCAAAAAATGCAGTTCCAGTTGTTG  
 AAAAGTCCCTTTATATTTAGCCTGGATCATCCACATACCATATCTAGGATTAAGACGGAATCTTGAAGTCAAGGAAAAGAGATAATTTCCAAATGATCA  
 ATTTCTTCACTATGCAATTTCTGATCCTTCAAGGATCTATGAAGTTAAGACAGTTTCTCTTTGGCTGGCTTCAAGTCACTTCAACGAATAAACTC  
 TAACCTTACTGATTTGGTCTGGAGTATAAACAGGTTTGTCTGTATGAATGAAGAGAAATCCATTGTATAGGTTAATGGAATTTTTTGTATTTGAAA  
 AATGCTTTGATACAACCTTCAAATAACACATAAAGAACTTGGTTTTGCTCCAGGTAATTTGTTTGGTGTATTTGTTAAGACTGCCGAGTTTGGAAAT  
 TATTCTGTGAGGATAAATGAACATGGCTGAGGAGTAACTAAATTTTTATCAGGATAACTTTAATAGAGATTGTTGCATCAAAATGCTTCAGTGTAT  
 CCATAAATTTGAATCACAATGTTTTAGACTGCTCCAACACGGAAATTTTTGGTGTGAAATGACATATGTTTGTCTCTGTCCCAAGTTTTTCCAGG  
 AAGATTAAAAAACAAAGTATTTCCAAAAGGCCATGTTTGGAGGTAGCAGGAAATCATG

**Фигура 18F**



SEQ ID NO:7 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:3

GAGTGCAAAGTCAAGATTTTATGGCATTCTGTCTTGGTATTTTCTTTCAAGCAAGGATATGTTTGATAAGGGGCTACAGTTTCAGTGGGTCTCT  
 TCTTCGGGCCCAACCAACACCCTGACTGCTAACTTTACAGACTTGTTCAGTCTATTGGCACTGACATCTGATAGCCCTTGGGGACCTGTTTTCGGC  
 TCCCTCAAGGCTATCCATTTCAAAAGTCGTAACTCATCAGCTTGTGCTTACTCTAAAGAAAGTGTATCTGATTCTAGGCTAGGTTTCCAAAGCCAGA  
 GGAGGAGCAATCCCCCGCCGAGGAGGAATCTCTGTGCAGCAGAACTTTTCATTCACAGCTGTTAAAAAGAGGCTTTCAGCAAAATTTATCAAAT  
 TCTCTAACAATGCTTGACAGGATGGACACGTTGTGTCTGTGGGCAATATTCAATCCAGGTGGAGGAATCTAGAGGATATATACTTGAACCTGAA  
 ATTGTGTTGATCTGCAGAACCTTTGCCATGATAAATACTGCTTCCCTTCCAGGTTGGCATTGGTACAGCTCATCTTTAATGAAGGTGACC  
 TCCGAATCTCATEAGCAGCTTCCCTGTTTTGTAAGTGACCAGAAGAGTCGCAGTGTACTTGCACAAAACATTTTCTCAGTGGCTGATGTGATCCTG  
 ACTTATAAGCATATGCAGTCTCTGTTTACAGGCTTCTCTTTCTGGAGTCTGCAGAGATGGCTAGGTCTACTTCTGCTGCAGTTGCCACAGTCA  
 GCTTCCACACATGTGCAAGCTGCTCCTTACAGACTTTCTGAAGCCTGGTGTCAAGAAATGCTATAAATCATGGTGCAGCTGCTTATCTGTCTGTGATAC  
 TCGTACACCGTGAAGGTAGCAGGATTCAGAAACCCAACTTGGAAAAGTTCAAATATCCGGAACCGGACACAGAGGAAATCTCTGGAGGGGATCGA  
 ATTCAGTTGCAGATGACATGGCCATCTTGTCTGGTAATCAGTTAGTGTGATCCACTCTTCCACAAGAGCCGTAATCTTCTCTGTTTGTCTC  
 GATTCAGCTGGCAGTATATATCCATTACTGCATGGGAGGACCCGGATGTTGACTCCTCCTGCTGGGCTTGTAGCTGGCCATGCTATTATGGCT  
 TGAATCCAGAGTCACTGAGGCTGAAGTGGCTGGATGCTCAATATCTTGGGTATCAATTTCAAGTAAAAGCTGCAAAATCTCAGAGACACTAATT  
 TTGTGAACCACAGTTTTACATATACTGTGGCAAGCCACTGCTGTAGCCTGTGCTGACACAAGGTCATCATTGAGAGTACCTCCACTGGCCTCCC  
 CAGAAATGCTTCTGTCCACTATACTTGTGGAAGTCACTTCTGTGTAGGGACATTGATGTCCATATCAAATGAATTTGTTTTAACAGGAG  
 TGAATATTCTGCAGGCTCGATGGCATTAACTGATCTCTGGGTGAAATAAAGCCGCTCCATACCTCTGCTTTCAGATAGCCACTTGTATGATGG  
 GGTGGCGTAATTCATATCTTCAAGTTCAAGCTGGCGAGCAAAGCATAGGCTGTGGTTCAACCATACCTGCTGTGCCGCTGCTGGGCACAGAGCT  
 GTCTGGACGTTTGAAGGTATCTTCCAGTAACGGTAAATGGGCGGATCACCTTAAACAAAAGCTTCTTCTCAGGGCCGACACAATAGACGAAAC  
 CTCGGTGGGTTCTGTCTCCTAGGAAAGAGCATAGGCTACAATGGCCAGTGTGAAGGTGCTCTTGGATGGCAGGGTGTTTCAAGCAGGAAGGAG  
 TCGGCTTATCTAGCGCTGTGTGGATTTTCATGGTGGGCATATGTCAATAAAGCCTTCTAATTCCAATCAGAAAAGGCTGTAAAGTACAAAAGTTT  
 CTCTTGGGCTTCCAGAGGCAAAAGTACCCTGTAATTTTATTGGTAGATATTGGAAATTTCTTGAAGAGCCGTTTTCCAGCTGACACTTCTCAACCAG  
 CCATAGCAAAGAGTTACAAAATGAGTTTTATCTCTGTTTACATATACTTGGCCACTGTCCAAAGCACTCTCAGAGCAAAGCTGTCCAGCAGGACTAG  
 CGCTCGCCCCCTTCCACATGCTGTAGGAATAGTCAGCGTTTCTGTAGGACATGACGCTCACCACCCCTGTTTTATTTTTTCTCAGGCTCTGTCTTT  
 ACTCAGTGTATCAGGATAGAAAATATCCAATGTTTTCTGCTTCCAGGTAGTGGAAAACATAGAACCCGGAGCTATGCTCATGAGCTGTGCTCTG  
 CACTCCCTTGGGAGGTTGGTTAGGATGTTGATGCCCTTCTTACTCAGAACCGTGGACAAGAACTCCCTTACAAGCACTCTTTCAGACTCAAAAATC  
 CTTCACATTTGGTCTTGGGACCAAATCTAATGGGATCCTGTATGGGAATCTTCTGCTGTAAACAATACCACGAATCCCTTAGGGTCCAGAATC  
 ACGCCGGCATAGCTTCCCTTCTGACTCCTTCTGGCACTACCCGTAATGTCTTACTAAGATGTCTTCCCAAATGAGGCTCTAGTGAAGTTTATG  
 GAGTGAAGCCAAATTTCCAGAGGAAGCAGGGTGAAGGTCAACAAGTACTGGACGAGCCCTCTATCCTCTGGAACACACATCTGGAGGGCTGGA  
 GGTGTGAAGGCTAGCAGCTGAGCTTCCCTGAAGTGCAGATCCCTTACTCAGAACCGTGGACAAGAACTTTTAAACACAGAATTTTGGCTGAGCTATAGTTGTA  
 ACAGTCTTTCAATGGATCTGTCTCCTCGCACAAACAGAATATGGTATGTTCACTCCAGGAAGACTTCTTGAACACCTTTGCCTGAGTGTATCA  
 GCAACACATATACCATTTGCTGAAATGCCAATGCCCTGAATTTCCAAAGTCTTACTGAGTCAAGGACGCTGACCTGCAGCTGTTTCTTTTGGGAAC  
 GCGATGAATTTCCCATAGCAGCTCTCTGAAAGTAGCTTGGATATCTGCTTCTCATCTGTAACAGGGTCTTAATGTGGATCTTCCAGTTGGA  
 CAGGTTATGSGGCTTCTTTCCGATCTGTTCGCAATAGTACAGCACTCGTGAAGGCCCTGATGCAGAGAGGGCTATGGTAACCCGGGCCAC  
 TCGCTTCCACAGGTTTCGTAGAAAGTTCACTCGGGCTCCGTCATAGCAGCAATTTCTTGGCACACTATGTTGTACTTAGCAGCTTGTCTTCTATTTT  
 TGCTTAGGAGATGCAGGTTTCTCTTACCTGAGAAATTTCTTACAAGAGTCACTACGATAATGGGAGTCACTCGGTTTGGCTTGGTGAAGAGGT  
 GAGCCAGCTAGATGGAATACATCTGCATTGTCTATGGCCACCCTGCCCCACAGCCAGGTCACCTTTTATCCAAAGCTTGAAGACTCTTTGCAT  
 GGCCCTTTGGGCTTCCCTGGACTTATACACAGCTCTGTCCACTGCTGATAGTGTACCCATGAGTCTGCTTCACTCAGTCCCATGTCAAGGGACACAGT  
 TTGGCTGGAGAATACACATATTCATCTGGAGACAGATGGACTGGAGCTGGTGGCCACTTCTCTCAATATTTATCCAGACTGCGTCAGCCACTA  
 ATTCTGCTGTTTCTCCCTGTGACTATGTAATAGACCAGGAGTCTGCTGAAGGAACCATGTTCTGTGTCACTGGAATATTTATATTTTATAGGTTG  
 AGGAGAAAAGTTTCTCTTGTGGCGTACTGTACAATTTGGCTTGGATAAAATCAAGTAATATAGTGAGTTATTTGTGATATATGGGCTCTTGG  
 GGGTAACCATAATATTCAGGTATTTCCCAAGCATGGGCTTGTAGTTTTCAGTCCAAGCGATGTAATGTAACCTTTGGCTGAGAGACGAGTACGC  
 AACTGCTTGTACTCTTGTGCTGCTGATTTCTTCCGGAAAGTTCTGGGTCACTCAGTTCTGATCTCAAATTTAGCACCTTCACTTTGATGGGAGGTT  
 CAGCACAAAACAGCTACTCCATCAGTGTCTAGTGTGCTCCTCTTTGTTTCCAAGTCAAGTGTCTTGTATTACACTGACTGTTTGTGCCATCAG  
 AGTTACTGGGACCCCTCTACCGCTGCTCGAGTGAATCTTAACTGTGCTTGTGAAATGGAAATCCCGGCTTCCAGAAAAGAGGAGTAGCG  
 ACCAAATTCAGTGTAGGGAGAGAGGACATATTTGACTCCAGGATTTCTGCTCTTCTGAAAATCCACCTGAAGATTCTGTGACTGTTACTGCAAT  
 ATAAAGGACTTGTGTTTAAAGTCTCTAGACTGTTGTAGBACAGCTTTAACTGCTGTTTCAGAATCAAAGAGACTGTGAGCAACTCCGTCACCA  
 ACTTTGGGCTTGTGGCTTGTGCATCATCTGCTTCTCCTCATCTTTATGTCTCTCAATCCAAAAAGGCATACACTCAGCATCAGGTACCAC  
 TTTATATAAAAATATCTTCTTCCAGTGATTTCAAAGTCTTAAAGTTTTATAGCCAATGAAGGTTCTTCTAGTCTATTGAAACAGAGAATCGT  
 GGCAGACATATCTTAAATTTCAAAGTATGCAGTCCAGTGTGTTGAAAATCTTCTTATAGTTAGCTTAAATGTCCAAACACCATACTTGGGATTA  
 GATGGAATCTTGAAGTCAAGAAAAGAGATAATCCGGTGTAAATCTTTCTTCAATGTCAACTTCTGATCTTCCGGGCTTATGAAAAGTTAAGAC  
 AGTCTCCCGTTTGGCTGGCTTCAAAGTGTCAACCCAGAGAATAGACTCTGATCTTACTGACTGGTCCGGCTGTAACAAGTTTGTCTGTATGGATGA  
 AGAGAATCCATTGTTATAGGTAATGGTATTTCTTGTATTTGAAAAGTGTGTTGACACAACCTCCAGATACAGCTGAGAGACTGGGCTTCTTCTC  
 TAGGAACCTGATGGGCTGTAGTGTCAACAGTGGCGTTTTGGAATTTGTTTTCCGGGGACAAATTAACATAGCTGAAGAGAGGAGTACTTTTT  
 GTCAGGATAGCTTTTATAGAAAAGAGTGCATCAAATGCTTCAAGTGTAGCCATGACTTGAATTAACACATTTTCAGACGAGCCGACCCGGAGGAT  
 TTGGGTGCTGAAATGACGTAGGTTTGTCTGCCCCAAGTTTTGTCCAGGAAAATTAAGACAAAGATTTCCCAAGACCCATGGCTGGTAGCG  
 GCATAAACCCATGGGCTGCTCCTGTAACCACTTCTCTTTAAA

**Фигура 18G**

SEQ ID NO:8 – последовательность, обратнo-комплементарная SEQ ID NO:4

TACAGTTGAGTGCAAAAGTCAAGCTTTATGGCATTTCGTCCCTGGTATTTTGTTCAGCAAGCAAGACCATGTTTCCTAAGGGGTACAATTTCAAGTG  
 AGTCTCTTCTCCGGCCCCAACAAACACCCCTGGCTGCTAACGTTACAGACTTGTCCAGCTTATTGGTGTGATGTCCAATAGCCTTGGGGACCTGC  
 CTTCGGCTCTCCACAAGGCTATTTGTTTCACAAAGTAACTCTTCAACTTACGCTTACTATAAAGAAAATGATCCGATTCTAGGCTAAGTTTCCAAAGC  
 GATCCTGGCTCTAGGAGCCACCAACAGGAGTACCCGGGAAGGCCACCGCAGCAGAAGTCTCCTCAGGCAATTTTACAGCCATTTAGAAAGATGTCTTC  
 AGCGAACTCGTCCAAATTAGCTACAACCGCTTGGCAGGATGGACACGTTGTCTGTGGGCAATATTCAATCCAGGTGGAGGAATCTAGAGGGTA  
 TATACTTGAAACTBAATTTGTTTGTATGTCAGAGCCTCTTGGCCATGATTAATATTGCTTCTCTTACCAGGTTGGCGTTGGTACAGCTTATC  
 TTTTAAATGAAGGTGATCTCAGAGTCTCTCAGCAGCGGCTTCCCTGTTTTGAATAATCCAGAAGCGTCCGAGTGTACTTGACAAAAATGTTTTCT  
 TCCGTGGCCGACGTGATCCTGACCTTATAAGCATAAGCAATCTCTGGTTTACATGCTGTTCTTCTGGTGTCTGCAGAGATGGCCAGGTCAGTTCT  
 GCCTGCAGTTGCCACAATCAGCTCAACGCATTTGCATGCCGCTCTTACAGACTCTGAAGGTTGGTGCAGAAAGCTGTAAATCATGGTACA  
 CTGCTTATCTGGTCTGTGATACTCTACACCGTGAACGTAGCAGGATTCAGAAACCAACTTGGAAAAATTCAAATATCCGGAACCSAACACAAAGG  
 AAATCTCGGAGGGAATCGAATTCATTCAGAAATAACATGACTGTCTTTGATCTGGTAAATCAGTTAGGAGTTGATCTACTCTTCCACAAGAGCTCG  
 TAAATCTTGGTTTGGCTCCGATTCCGGTCCGCGCAGTATATCCATTACTGCTAGGAGCCAGTATCCGTTTAAATGGTATCCTGGTGAATAAAAGCCGCTCCATACCTCTGCTCT  
 GGCACAGGCTATTATGCGCTGTGTCGAGTCACTGTAGCTGAGGTAGCTGGAGGCTTCAACTTCTGGGTATCAATTTCAAAGTAAAAAGTCAA  
 AATTCCTCAGCGACACTAGTTTTGTGAACCAAGTTTTACATAACTGTAGCCAAAGCCACTGCTATAGCCTGTGGTGACGATGAGGTCATATTGAG  
 GGGTACCTCCTAGGCTCCGAGGAAAGTTCTCTGTCTACTTATACTGGTAGAAATCCCTTTGTTTGTAGGAGACATTGATATCCATATCCAA  
 ATGAAGTTTAAACCCAGGAGTGAATCTCTGTCAGGCCCTCGATGGCGTTAATGGTATCCTGGTGAATAAAAGCCGCTCCATACCTCTGCTCT  
 CAGATAGCCACTTGTATGATCGGGTGGACATAACTCGTCTCCTCAGGTTCAGGCTGGTGGAGCAAAGCATAGGCCGTGGTTTCTACCATACCTGCTGTG  
 CCGTGTGGGGTCTGAGCTGTCTGGACGTTGGAGAGTGTCTCTCCAGAAACGGTAAATGGGGCGGTTCTCTTAAACCAAAGCTTCCCTTTCAGGG  
 CTGACACAATAGAACGAAACTTCGGGTGGGTTCTGTCTCCAGGAGAGAGCATAGGCCACAATGGCCAGGGTGAAGGTGCTCTTGAAGGCGAGG  
 GTCCTTCAAGTAGGAAAGGAGTGAATCTTACCCAGCGCTGTGATGATTTTCCCGTGGGCATATGCCAATAGCCTTTCTAATTCACAGAA  
 GGCTGAAGATATAAAGTGTCTCTTGGGCTCAGCAGGCAAAATACCTGTAAATTTTATTGGTAGATATTGGAAATTTCTTGAAGATCCGTTTTC  
 CAGCTGACACTTCTCAATCAGCCATAACAAGGATTCAGATCGAGTATTGGTCTGTCTTACATACTTGTCACTCTCCAAAGCACTCTCAGAGCAAA  
 AGCTGTGACCAAGGCACTAGACTTGTCCCTTCCACATGCTGTAGGAATATGTCAGCGTTTCTGAGGACATGACGCTCACCAGCCCTTCTTTATTT  
 TTTCTGACAGGCTGTGTTTCTAGCTAACGTATCAGGGTGGAAAATTTCCAAATGGTTTCTGCTTCCAGGATGGGAAAACGTAGAAACACAGAA  
 TGCTCATGAGTTCTGCTCGGCGCTCCCTTGGGAGGTGGGTTAGGATGTGATGCTTCTTACTCAGAACCCTGGACAAGAAATCCCTATAAGC  
 AGTCTTTTACACTCAAAATCCTTTTACGCTTGGTTTTGGGGACCAATCTAATGGTATCCTGTATGGGAAATCTCTTCTGTCTGTAAACAAATCCATAA  
 ACTCCCTGGGGTCCAGAGTCAACCAGCATAGCTTTCCCTTTGATCCCTTGGCACTACCCGTAATGTCTTCACTAAGATTTCTTCCAAATGAAG  
 TCTTAGTGAGAAGTTTATGGAGTGAAGGCCAATTTCCAGAGGAAGCAGGCTGAAGGTACCAAGTGAATGGAGGAGCCCTTATTCTTGGCGCA  
 CACATCTGGAGGACCTAGAGGTCTGAGGGCTAGCAGCCGAGCTTCTGGAGTGCAGATTCCTCCACGGCAGACATTTAACACAGAACATTGCTCC  
 AGAGGTCTATAATGTAAACGGTCCCTTCAATGGATCTGCTCCCTCTGACAACAGAATATGGTATGTTTATCTCCAGGAAGACATCTTGAACAC  
 CTTTGCCTTGAGTGTGTCAGCAACACATATACCAATGTCTGAGATGCCGATGCTTGAATTTCCAGGTCTGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG  
 GCTGGTTCTTTGGGAACAGATGAACCTCCATAGCCAGCTCTCTGGAAAGTAGCTTGGATTCTGCTTATCACTGGTAACAGGGCTTTATTT  
 GGATCTTCCCAACAGCATGCTTTTGTGGTGGCTTCTTTTGGATCTTATCCGCAATAGTACAACACTCGTTGAAGGCCCTGATGCAAGTGTGGCCCTA  
 TGGTCAACCCGGCAACTCGCTCACAGGTTTCTGATTTTCTCGGCTCCATCATACAGCATTCTTGGGCACACGGTGTGTTAGGAG  
 CTGTTCTTCCACTTTCTGATGCAAGGAGCTGCAGGTTCTCTTGGCTGAGAATTTCTTACAAGAGTCACTGTTGTTGGGAGTCACTGCGTTTGT  
 CATTGGTGAAGGAGGAGCCAGCTAGATGGAATACATCTACATTGTACGCGCCACCCTGCCCCACAGCCAGGTCCTTGTATCAAAAGC  
 TTGGAACTCTTTGATGCGCTTTTGGCTTCCCGGACTCCATACACAGCGCTGTCCACCCGAGATAGTGGCAACCATGAGTCTGCTCAGTCA  
 CATGTCAAGGGACACAGTTTGGCTGGAGAATACAGCTTTTATCTGGAGACAGATGGACCTGGAGCTGGTTGCCACACTTCTCTCAATGTTTATCC  
 AGACTGCGTCAAGCAACCAATTTCTGCTGTCTGCTCCCCGTGACTATGTAATAGACCAGGAGCCGCTGAAGGAACCATGCTCTGTGCTGCTGGAT  
 GTTATATTTGATAAGATGAATAGAGAGTTTCTCTTTGTGCCATCTGTACAATTTTGGCTTTGGATAAAATCAAGTAATATAGTGAATATTT  
 GTCAATATATGACTCTTGGGGGTGACGATAATTCAGATATCTCCCAAGCATGGGCTTGTAGTTTTCAAGTCCAGCCAATGTAATGTAACCT  
 GGCTGAGGGATGAGTATGTAACCTCATATTCTTGTGGCTTGAATTTCTCGGGAAGTTCCGGGGCATCAGTTTTGACCTCAAACCTCAGTGAT  
 GTCACCTCTGATGGAGGTTCAACCAAAATGAAGCCAATCCATCAGCAGAGTGTGTGATGCTCTTGGTTCCAAGTCAAGTGTCTCTGATTCA  
 ATTGACTGTTGTGCCATCAGAGTTACTGGGACCCCTCTACCAACTGCTCGAGTGAATCTTAACTGTACTTGTAGGAAATGGAATCCCAAGGCT  
 TCAGGAAAAGAGGGGTAGCGACCAAAATCAGTGATAGGAGAGAGGACGATTTGATGCCAGGAATTTCTGCTCTTCCGAAAACCCACCTACAA  
 GGCACGCAAGCACTGAGTTAATGTTTTCCGGAAGATGATGGCGGCTGTAGGACATCTGCGTCTCTGTGCTATCCAT

## Фигура 18H

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202391438**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:  
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C12N 15/113, C07H 15/04, A61K 31/7088, 31/712, 3/7125, 31/713, 47/14, 48/00

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

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X Y	WO 2005/116204 A1 (RNAI CO LTD et al.) 08.12.2005, реферат, параграфы [0023], [0048], SEQ ID Nos: 167137, 504758	1-7, 15-16 8-14, 17
X Y	TANG Kai et al. Protective effect of C5 shRNA on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2012, v. 90 (10): 1394-402. doi: 10.1139/y2012-114, стр. 1395, фигуры 1-7	1-7, 15-16, 18-25 8-14, 17
X Y	ZHENG Xiufen et al. Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. The American Journal of Pathology, 2008, v. 173(4): 973-80, страницы 974-975, раздел "Material & Methods"	1-7, 15-16, 18-25 8-14, 17
X Y	WO 2009/108931 A2 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 03.09.2009, реферат, параграфы [0042], [0049], [0061], пункты 1, 3, 5, 9, 11 и 13 формулы	1-7, 15-16, 18-25 8-14, 17
Y	US 2009/0239814 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 24.09.2009, параграф [0633], фигуры 1, 13-14, пункты 12, 13, 15 формулы	8-14, 17
A	SCHREZENMEIER Hubert et al. Drugs that inhibit complement. Transfusion and Apheresis Science, 2012, v. 46 (1): 87-92 doi: 10.1016/j.transci.2011.11.012	1-25

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

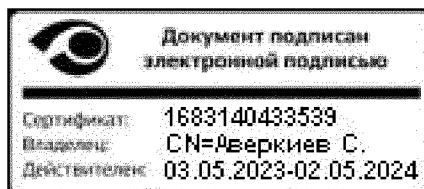
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи  
евразийской заявки или после нее«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию  
и т.д."P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки,  
но после даты испрашиваемого приоритета"«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и при-  
веденный для понимания изобретения«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,  
порочающий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,  
порочающий изобретательский уровень в сочетании с другими документами  
той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 20 февраля 2024 (20.02.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202391438**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

*C12N 15/113* (2010.01)  
*C07H 15/04* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/712* (2006.01)  
*A61K 31/7125* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 47/14* (2017.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

СПК:

**A61K 31/7088**  
**A61K 31/712**  
**A61K 31/7125**  
**A61K 31/713**  
**A61K 47/14**  
**A61K 48/00**  
**C07H 15/04**  
**C12N 15/113**